

**УРОПАТОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ
ХРОНИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ
МАЛЫХ ДОЗ РАДИАЦИИ
ПОСЛЕ АВАРИИ НА ЧАЭС**

Под редакцией А.Ф. Возианова и А.М. Романенко

“Укрмедкнига”
Тернополь
2003

ББК 56.9+28.901
У-71
УДК 616.6-02-001.28

Рецензенты: член-корреспондент АМН Украины, профессор **В.Г. Бебешко**,
профессор **Т.И. Богданова**

Уропатологические аспекты хронического действия малых доз радиации после аварии на ЧАЭС: Монография. – Тернополь: Укрмедкнига, 2003. – 148 с.

ISBN 966-673-049-9

В монографии описаны принципиально новые данные о хроническом, долговременном (более 17 лет) действии малых доз ионизирующего излучения на почки и мочевой пузырь у лиц, проживающих в загрязненных радионуклидами регионах Украины. Указанным данным предпосылается краткая радиобиологическая характеристика аварии на Чернобыльской атомной электростанции. Впервые описаны изменения в почках при почечноклеточном раке, развивающиеся при хроническом действии малых доз радиации. Изложены результаты многопланового исследования и динамического наблюдения большой группы больных с доброкачественной гиперплазией предстательной железы, в уретелии мочевого пузыря которых закономерно обнаруживались изменения, описанные авторами, как “чернобыльский цистит”. Разработаны некоторые молекулярные основы патогенеза указанных изменений, значительно расширяющие существующие представления о канцерогенезе в почке и мочевом пузыре.

Книга рассчитана на широкий круг читателей, включающий онкологов, урологов, радиологов, клинических патологов, радиобиологов и генетиков.

ISBN 966-673-049-9

ББК 56.9+28.901
УДК 616.6-02-001.28

© Тернополь, “Укрмедкнига”, 2003.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
РАЗДЕЛ I. МАСШТАБЫ ЧЕРНОБЫЛЬСКОЙ КАТАСТРОФЫ <i>В.Г. Бебешко и И.П. Лось</i>	8
Глава 1.1. Общая характеристика аварии	8
Глава 1.2. Структура и характер источников аварийного облучения	11
Глава 1.3. Характер и уровни радиоактивного загрязнения почвы, воды, продуктов питания на территориях, пострадавших в результате аварии	15
Глава 1.4. Дозы облучения	28
Литература	33
РАЗДЕЛ II. ХРОНИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ МАЛЫХ ДОЗ ИОНИЗИРУЮЩЕЙ РАДИАЦИИ НА ПОЧКИ <i>А.Ф. Возианов, А.М. Романенко, Antonio Llombart Bosch</i>	35
Глава 2.1. Экологический патоморфоз почечноклеточного рака у жителей загрязненных радионуклидами регионов Украины	36
Глава 2.2. Сопоставительный анализ гистологических особенностей и пролиферативной активности почечноклеточного рака и онкоцитом почки у больных после аварии на ЧАЭС	49
Глава 2.3. Радиационная склерозирующая пролиферативная атипическая нефропатия (РСПАН) перитуморальной ткани при почечноклеточном раке	55
Глава 2.4. Повреждение генов p15 ^{INK4B} и p16 ^{INK4A} , обусловленное оксидативным стрессом в почечноклеточном раке	65
Глава 2.5. INK4 α /ARF локус: роль факторов, контролирующих клеточный цикл для развития почечноклеточных эпителиальных опухолей (ПКЭО)	74
Литература	85

**РАЗДЕЛ III. ХРОНИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ МАЛЫХ ДОЗ
ИОНИЗИРУЮЩЕЙ РАДИАЦИИ НА УРОТЕЛИЙ
МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ ЧЕЛОВЕКА.**

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ ПАТОГЕНЕЗА

“ЧЕРНОБЫЛЬСКОГО ЦИСТИТА” *А.Ф. Возианов,*

А.М. Романенко, Shoji Fukushima 93

Глава 3.1. Молекулы и гены, связанные с канцерогенезом
(p53, cyclin D1, PCNA, p21^{WAF1/Cip1} и mdm2) 96

Глава 3.2. Маркеры оксидативного стресса 110

Глава 3.3. Нарушения репарации поврежденной ДНК 119

Глава 3.4. Экстрацеллюлярные и мембранозные
молекулярные повреждения 124

Литература 131

ЗАКЛЮЧЕНИЕ..... 138

Литература 146

ВВЕДЕНИЕ

Семнадцать лет отделяют нас от аварии на Чернобыльской атомной электростанции – одной из крупнейших в истории человечества, характер и последствия которой определены мировым сообществом, как ядерная катастрофа. В результате этой аварии в окружающую среду был выброшен радиоактивный материал, активность которого эквивалентна 6 атомным бомбам, сброшенным на Хиросиму, площадь радиоактивного загрязнения территории превысила 50 тыс. кв. км. В соответствии с законодательством Украины, к числу пострадавших вследствие аварии на ЧАЭС, отнесено более 3 млн. человек, в том числе более миллиона детей.

В эти годы проводилась активная работа по преодолению последствий катастрофы для нынешнего и грядущих поколений. Исходя из общей гуманистической направленности социальных программ нашего государства, ее законодательных и исполнительных институтов, медицинские проблемы, связанные с уменьшением или ослаблением негативного воздействия факторов Чернобыльской катастрофы, остаются приоритетными в области медицинской науки.

Широкий круг ученых и специалистов во главе с Научным центром радиационной медицины АМН Украины на протяжении всех этих лет активно изучал радиационно-гигиеническую ситуацию, сложившуюся в Украине после аварии на ЧАЭС, закономерности ее формирования, а также дозы облучения различных контингентов населения. Проводились широкомасштабные эпидемиологические и медико-демографические исследования динамики и закономерностей изменения состояния здоровья лиц, подвергшихся облучению. Детально освещались вопросы заболеваемости пострадавших детей и взрослых, особенности клинического течения, эволюции и исходов наиболее распространенных болезней, разработки и усовершенствования методов профилактики, диагностики, лечения и реабилитационных мероприятий.

С течением времени среди медицинских аспектов радиационного поражения на первый план вышли новые проблемы,

среди которых хроническое, долговременное действие малых доз ионизирующей радиации (ИР) на организм человека привлекает в мировой литературе все больше внимания. В условиях Чернобыльской катастрофы этот аспект приобретает особенно важное значение, так как около 10 миллионов населения вот уже более 17 лет проживает в загрязненных долгоживущими радионуклидами регионах Украины, России и Беларуси.

На протяжении последних 10 лет Институт Урологии АМН Украины плодотворно сотрудничает с крупными научными центрами Швеции, Австрии, Испании и Японии, благодаря чему появилась возможность провести уникальные совместные исследования на молекулярно-генетическом уровне, освещающие тонкие механизмы хронического действия малых доз ИР на почки и мочевого пузырь. Актуальность именно урологических аспектов этой проблемы объясняется известным положением о преобладании ^{137}Cs (около 80 %) среди широкого спектра радионуклидов, загрязнивших окружающую среду после аварии на ЧАЭС, 90 % которого экскретируется почками, накапливается и удаляется с мочой, что обуславливает значительный риск поражения в первую очередь почек и мочевого пузыря инкорпорированным ^{137}Cs у лиц, проживающих более 17 лет на загрязненных радионуклидами, и в первую очередь ^{137}Cs , территориях Украины.

В настоящей монографии помимо краткой радиобиологической характеристики Чернобыльской катастрофы, проведенной Научным центром радиационной медицины АМН Украины, обобщены данные, полученные в Институте урологии АМН Украины в сотрудничестве с зарубежными коллегами из вышеперечисленных стран, касающиеся изменений в почках при почечноклеточном раке, а также в уротелии мочевого пузыря у лиц, проживающих на загрязненных ^{137}Cs территориях Украины. Проведенные авторами исследования позволили выявить ранее неизвестные патологические состояния почек и мочевого пузыря, развивающиеся при хроническом действии малых доз ИР, изучить молекулярные основы их патогенеза и создать теоретическую базу для разработки новых методов профилактики и лечения выявленных патологических состояний.

Предлагаемая вниманию читателей книга, адресована широкому кругу врачей, а также специалистам в области клинической радиационной медицины, радиобиологии и генетики. Она призвана частично восполнить существующий в радиационной медицине пробел в области изучения долговременного и постоянного действия малых доз ионизирующей радиации на организм человека, равно как и раскрыть новые механизмы канцерогенеза на примере развития рака почки и мочевого пузыря.

Президент АМН Украины, академик **А.Ф. Возианов.**

РАЗДЕЛ I. МАСШТАБЫ ЧЕРНОБЫЛЬСКОЙ КАТАСТРОФЫ

В.Г. Бебешко и И.П. Лось

ГЛАВА 1.1. Общая характеристика аварии

Авария на четвертом энергоблоке Чернобыльской АЭС произошла в ночь с 25 на 26 апреля 1986 г. при проведении проектных испытаний одной из систем обеспечения безопасности. Суть испытаний состояла в использовании механической энергии останавливающихся турбогенераторов (т. н. выбега) для выработки электроэнергии в условиях наложения двух типов аварийных ситуаций: полной потери электроснабжения АЭС, а также максимальной проектной аварии, при которой происходит разрыв трубопровода большого диаметра циркуляционного контура охлаждения реактора.

Испытания выявили некоторые серьезные просчеты в конструкции реактора, наличие которых в сочетании с недостатками в организации испытаний привело к тому, что реактор к моменту полного вывода на режим испытаний находился в неустойчивом, трудноуправляемом состоянии. Включение аварийной защиты привело к непредусмотренному повышению давления и подъема уровня в барабанах – сепараторах, повышению давления и разрыва технологических каналов в реакторном пространстве. В результате в 01 ч 23 мин 49 с произошли два мощных взрыва с разрушениями части реакторного блока и машинного зала. Они повлекли за собой возникновение пожара и выброс в атмосферу радиоактивных веществ.

По официальным оценкам, суммарная активность выброса составила 50 МКи (без инертных газов) – около 4 % общей активности топлива в реакторе. Состав выброса в целом соответствовал изотопной структуре топлива в реакторе, в котором преобладали короткоживущие радионуклиды, в первую очередь, йод-131. Из долгоживущих радионуклидов в составе выброса преобладал цезий-137. Стронция-90 было значительно меньше. Еще меньше было плутония-239, который, входя в состав горячих частиц, обладающих чрезвычайно высокой удельной активностью, представляет наибольшую опасность в перспективе, благодаря медленному распаду (табл. 1.1.1).

Таблица 1.1.1. Радионуклидный спектр активной зоны реактора и выброса на момент аварии

Содержание радионуклидов в активной зоне на момент аварии			Суммарный выброс в пересчете на момент аварии	
Нуклид	период полураспада	активность (ПБк)	процент от запаса	активность (ПБк)
¹³³ Xe	5,3 д	6500	100	6500
¹³¹ I	8,0 д	3200	50-60	~1760
¹³⁴ Cs	2,0 г	180	20-40	~54
¹³⁷ Cs	30,0 г	280	20-40	~85
¹³² Te	78,0 ч	2700	25-60	~1150
⁸⁹ Sr	52,0 д	2300	4-6	~115
⁹⁰ Sr	28,0 г	200	4-6	~10
¹⁴⁰ Ba	12,8 д	4800	4-6	~240
⁹⁵ Zr	1,4 ч	5600	3,5	196
⁹⁹ Mo	67,0 ч	4800	>3,5	>168
¹⁰³ Ru	39,6 д	4800	>3,5	>168
¹⁰⁶ Ru	1,0 г	2100	>3,5	>73
¹⁴¹ Ce	33,0 д	5600	3,5	196
¹⁴⁴ Ce	285,0 д	3300	3,5	~116
²³⁹ Np	2,4 д	27000	3,5	~95
²³⁸ Pu	86,0 г	1	3,5	0,035
²³⁹ Pu	24400,0 г	0,85	3,5	0,03
²⁴⁰ Pu	6580,0 г	1,2	3,5	0,042
²⁴¹ Pu	13,2 г	170	3,5	~6
²⁴² Cm	163,0 д	26	3,5	~0,9
Всего		73559,05		~10933,007

В результате первичного выброса 26 апреля 1986 г. сформировался очень узкий (длиной до 80 км и шириной 1-5 км) западный топливный след, представленный, в основном, мелкодиспергированным (в результате резкого возрастания энерговыделения) ядерным топливом. Одной из характерных особенностей аварии на ЧАЭС является наличие в выпадениях топливных горячих частиц с матрицей, состоящей из оксидов урана с разнообразными примесями. Радионуклидный состав горячих частиц близок к составу ядерного топлива 4-го блока на момент аварии, но с фракционированием летучих высокоподвижных продуктов деления. Во время аварии на ЧАЭС почти 3 % ядерного топлива было выброшено за пределы реактора в

виде горячих частиц, о чем свидетельствуют данные о выходе циркония-95, церия-141 и 144, а также трансурановых элементов.

При начальном взрыве 26 апреля из локальной области реактора были выброшены большие топливные частицы размером в десятки и сотни микрон, которые, имея большую скорость осаждения, выпали в непосредственной близости от реактора, а также неокисленные мелкие топливные частицы (медианный радиус порядка 3 мкм) в виде кристаллов (зерен) диоксидного уранового топлива.

В результате остаточного тепловыделения и разогрева топлива до температур 1800-2300 К° происходил выход из ядерного топлива высокоподвижных летучих продуктов деления (йод, теллур, цезий) и их подъем в конвективном потоке на высоту более одного километра (26 апреля) и до 600 м (в последующие дни). Это привело к образованию северо-западного (достигшего Швеции), западного и северо-восточного конденсационных радиоактивных следов с незначительной частью окисленных топливных частиц. “Цезиевые” пятна в дальней зоне сформировались за счет выпадений цезия-137 с осадками.

В соответствии с международной шкалой оценок авария на 4-м блоке ЧАЭС квалифицируется как авария седьмого (наивысшего) уровня. Эта авария привела к значительному загрязнению окружающей среды и, благодаря глобальному характеру влияния на население и окружающую среду (радиоактивные выпадения были зарегистрированы на удалении более 2 тыс. км от места аварии, затронув в той или иной степени территорию, по крайней мере, 20 государств), получила название “Чернобыльская катастрофа”.

ГЛАВА 1.2. Структура и характер источников аварийного облучения

В результате аварии в окружающую среду были выброшены около $1,1 \cdot 10^{19}$ беккерелей (Бк) радионуклидов, что привело к практически повсеместному радиоактивному загрязнению территории Украины. Загрязнение свыше $1 \text{ Ки} \cdot \text{км}^{-2}$ ($37 \text{ кБк} \cdot \text{м}^{-2}$) по цезию-137 общей площадью 42 тыс. км^2 наблюдалось на территориях 18 из 25 областей.

В настоящее время основное загрязнение территории определяется цезием-137 и в меньшей мере стронцием-90. Трансурановые элементы Чернобыльского происхождения также распространены практически по всей территории Украины. Однако в опасных количествах они сосредоточены преимущественно в Зоне отчуждения, в непосредственной близости от источника (5-10 км).

На протяжении первых дней и недель после аварии радиационная обстановка определялась, в первую очередь, процессами распада короткоживущих радионуклидов, среди которых важную роль играли изотопы йода: I-131, -132, -133, -135.

В дальнейшем доминирующий вклад в дозовые нагрузки начали вносить долгоживущие радионуклиды, в частности цезий, стронций, а в пределах Зоны отчуждения – также трансурановые элементы.

В настоящее время основным источником “аварийного” облучения населения является цезий-137, который определяет 90-95 % суммарной дозы. Цезий-134, стронций-90 все изотопы плутония и америций суммарно дают вклад не более 5 %. Наибольшую биологическую опасность представляет собой цезий-137.

Характеристики некоторых радионуклидов

Йод. Из всех радиоизотопов йода наибольшее значение имеет *йод-131* с периодом полураспада 8,04 суток. Он является бета- и гамма-излучателем. Это очень активный элемент, который хорошо усваивается растениями, водными организмами. При попадании в желудочно-кишечный тракт с пищей (молоком, огородной зеленью, овощами и т.д.) на 100 % всасывается в кровь и избирательно накапливается в щитовидной железе (до 60-80 %).

Содержание около 2200 Бк (0,06 мкКи) йода-131 в щитовидной железе взрослого человека создает дозу облучения в 10 мЗв. Большие

дозы *йода-131* приводят к существенным изменениям в нервной и эндокринной системах.

Радиоактивные изотопы йода могут индуцировать опухоли в щитовидной железе и других органах. При накоплении в легких они могут способствовать возникновению заболеваний бронхитом, пневмонией.

Цезий-137. Из 30 радиоактивных изотопов цезия большинство являются короткоживущими с секундными и минутными периодами полураспада и только два радиоизотопа долгоживущие – *цезий-134* с периодом полураспада 2,06 года и *цезий-137* с периодом полураспада около 30 лет. Наибольшую радиологическую опасность представляет собой цезий-137. Это бета-излучатель со средней энергией бета-частиц 170,8 кэВ. При его распаде образуется дочерний радионуклид барий – 137 с периодом полураспада 2,55 мин, который сопровождается испусканием гамма-квантов с энергией 661,6 кэВ. Химические и биологические свойства цезия аналогичны свойствам калия. Подобно калию он активно включается в биологический круговорот, мигрирует по биологическим цепочкам, достигая организма человека.

Растворимость солей цезия, выпавших на почву с глобальными осадками, составляет 80-100 %. Поскольку цезий не образует трудно растворимых соединений в широком диапазоне рН, он легко доступен для растений и накапливается в них.

В организм животных цезий попадает с загрязненным кормом, водой и, в меньшей мере, с вдыхаемым воздухом. Всасываемость из желудочно-кишечного тракта в кровь составляет для крупного рогатого скота 90-100 %. В организме человека всасываемость *цезия-137* достигает 100 %.

Цезий накапливается в основном в мягких тканях, только 4 % его откладывается в костях. Выводится цезий из организма с калом (10-30 %) и мочой (70-90 %). У лактирующего животного и кормящей матери цезий хорошо выводится с молоком. Период полувыведения цезия из организма зависит от вида животного, его возраста и характера питания. У взрослого человека он составляет около 100 суток, у детей до 1 года – 10-20 суток. Цезий хорошо переходит из организма матери в плод. Величина перехода зависит от срока беременности и продолжительности поступления радионуклидов.

При поступлении цезия в водоем он быстро мигрирует в донные отложения, усваивается планктоном и бентосом. Рыба активно накапливает изотопы цезия и может быть одним из основных источников поступления его в организм человека.

Накапливаясь в мягких тканях и почти равномерно по всему организму, цезий создает внутреннее облучение, которое при равновесном содержании цезия $\approx 246,5$ кБк или $6,66$ мкКи в год может достигать 10 мЗв.

Внутреннее облучение *цезием-137* вызывает такой же биологический эффект, как и внешнее облучение организма при аналогичных дозах.

Стронций-90. Он хорошо растворяется в воде, поэтому его подвижность в почве довольно высока. Наибольшая растворимость стронция отмечена в почвах с низким рН и минимальным содержанием обменного кальция, поэтому из таких почв стронций легко усваивается растениями.

$20-30$ % стронция из желудочно-кишечного тракта человека поступает в жидкости организма. При недостатке кальция и белка в рационе питания, в определенные возрастные периоды, аналогично кальцию, всасываемость стронция может повыситься до $50-60$ %.

При вдыхании растворимые соединения стронция быстро элиминируют из легких, а плохо растворимые обмениваются в легких крайне медленно. Проникновение стронция через неповрежденную кожу составляет около 1 %, через поврежденную – почти 100 %. Независимо от пути и режима поступления в организм растворимые соединения стронция избирательно накапливаются в костях. В мягких тканях задерживается менее 1 % *стронция-90*.

Биологическое действие *стронция-90* при попадании в организм человека обуславливается бета-частицами, испускаемыми им самим и его дочерним продуктом распада – иттрием-90. Средний пробег бета-частиц в тканях животных составляет у *стронция-90* $0,5$ мм, иттрия-90 – 4 мм. В костной ткани из-за ее большей плотности по сравнению с мягкими тканями пробег бета-частиц меньше.

Накапливаясь в скелете, *стронций-90* остается там длительное время, постоянно облучая ткани, вследствие чего костная ткань и кроветворный костный мозг подвергаются облучению в большей степени, чем другие органы и ткани организма.

Плутоний. Из 15 известных изотопов плутония наиболее значимый – *плутоний-239* с периодом полураспада 24400 лет, излучающий при распаде альфа-частицы с энергией 5,5 МэВ. Он образуется в урановом топливе при захвате ураном-238 нейтрона с последующим относительно быстрым бета-распадом урана-239 и нептуния-239. Соединения плутония в почве малорастворимы, поэтому практически неподвижны и недоступны для корневой системы растений.

При поверхностном загрязнении листьев растений плутоний может попасть в желудочно-кишечный тракт, однако из него в жидкости организма всасывается плохо. При вдыхании облучает легочную ткань. При этом величина облучения в 100 раз выше, чем при поступлении с пищей.

ГЛАВА 1.3. Характер и уровни радиоактивного загрязнения почвы, воды, продуктов питания на территориях, пострадавших в результате аварии

Загрязнение почвы

Большая высота радиоактивного выброса (до 2 км) и изменчивость метеорологической обстановки в период 26 апреля – 10 мая 1986 г. (прежде всего изменение направления ветра) определили особенности последующего выпадения (осаждения) радиоактивных материалов на почву и воду, а также характер загрязнения территории (прежде всего его огромную площадь). Радиоактивные выпадения были зарегистрированы на удалении более тысячи километров от места аварии. На территории Беларуси, Украины и России, пострадавших больше всего, загрязнению цезием-137 с плотностью выпадений свыше $37 \text{ кБк}\cdot\text{м}^{-2}$ ($1 \text{ Ки}\cdot\text{км}^{-2}$), подверглась в совокупности территория 131 тыс. км^2 с населением около 4 млн. человек, в том числе 1 млн. детей. Вторая особенность выброса – неравномерность загрязнения территории радионуклидами. Наибольшее их количество выпало в Беларуси – оказались загрязненными более 13 тыс. км^2 (в том числе более 9 тыс. км^2 сельскохозяйственных угодий). Наибольшее загрязнение стронцием-90 и плутонием-239 обнаружено в радиусе 30 км от места аварии.

В целом по Европе ситуация характеризуется тем, что на двух третях ее территории авария на ЧАЭС оставила след, и уровни загрязнения превышают доаварийные.

До аварии, согласно материалам мониторинга окружающей среды, который на протяжении 30 лет проводился подразделениями Государственного Комитета гидрометеорологии, Министерства здравоохранения и Министерства сельскохозяйственной продукции СССР, на территории Украины запасы цезия-137 и стронция-90 в приповерхностных слоях почвы составляли $0,8 \div 2,2 \text{ кБк}\cdot\text{м}^{-2}$ ($0,02 \div 0,06 \text{ Ки}\cdot\text{км}^{-2}$) [1-3].

Систематическое изучение распределения изотопов плутония и америция в разных объектах окружающей среды практически не проводилось. В соответствии с отдельными научными публикациями отечественных и зарубежных исследователей, в северном полушарии на широтах, соответствующих месту расположения Украины (44-

52 градуса северной широты) плотность загрязнения поверхности почвы изотопами плутония и америция находилась в пределах $10-60 \text{ Бк}\cdot\text{м}^{-2}$ ($0,0003-0,0017 \text{ Ки}\cdot\text{км}^{-2}$).

Авария на Чернобыльской АЭС существенно изменила радиационную обстановку на территории Украины. Из-за целого комплекса причин, связанных с природными условиями и особенностями развития аварии, сложилась чрезвычайно сложная и разнообразная структура загрязнения по составу радионуклидов.

Главными объектами изучения до конца 1987 года были территории Киевской, Житомирской, Черниговской областей, где наблюдались уровни загрязнения выше $55 \text{ кБк}\cdot\text{м}^{-2}$ ($1,5 \text{ Ки}\cdot\text{км}^{-2}$), главным образом, в направлении “западного следа”. В том же году в Ривненской и Волынской областях было обнаружено поступление в рацион населения продуктов питания местного производства с повышенными уровнями содержания радиоцезия, в частности, более $370 \text{ Бк}\cdot\text{л}^{-1}$ в молоке и $3700 \text{ Бк}\cdot\text{кг}^{-1}$ в грибах. С 1988 года началось систематическое и планомерное обследование южных районов, а позднее и всей территории Украины. К концу 1992 года по результатам аэрогаммаспектрометрической съемки было установлено, что участки с уровнями загрязнения радиоцезием более $37 \text{ кБк}\cdot\text{м}^{-2}$, обнаруженные в восточных и южных районах, занимают площадь около 500 км^2 .

Радиоактивное загрязнение западного следа сформировалось, в основном, 26-27 апреля 1986 г. Кроме Киевской и Житомирской областей, в пределах Украины он охватывает северную часть Ривненской и северо-восточную часть Волынской областей. Преобладающее загрязнение здесь составляет $20\div 100 \text{ кБк}\cdot\text{м}^{-2}$. Отдельные пятна имеют плотность загрязнения цезием-137 до $190 \text{ кБк}\cdot\text{м}^{-2}$ ($\sim 5 \text{ Ки}\cdot\text{км}^{-2}$) (рис. 1.3.1). Характерной чертой Украинского Полесья, особенно его районов, расположенных в Ривненской и Волынской областях, являются аномально высокие коэффициенты перехода цезия-137 в цепи почва-растение, что существенно влияет на формирование доз облучения людей, проживающих в этих районах и употребляющих местные продукты питания.

Следующей по площади и уровню загрязнения выделяется территория южного следа, которая охватывает территории Киевской, Черкасской, Кировоградской, частично Винницкой, Одесской и Николаевской областей.

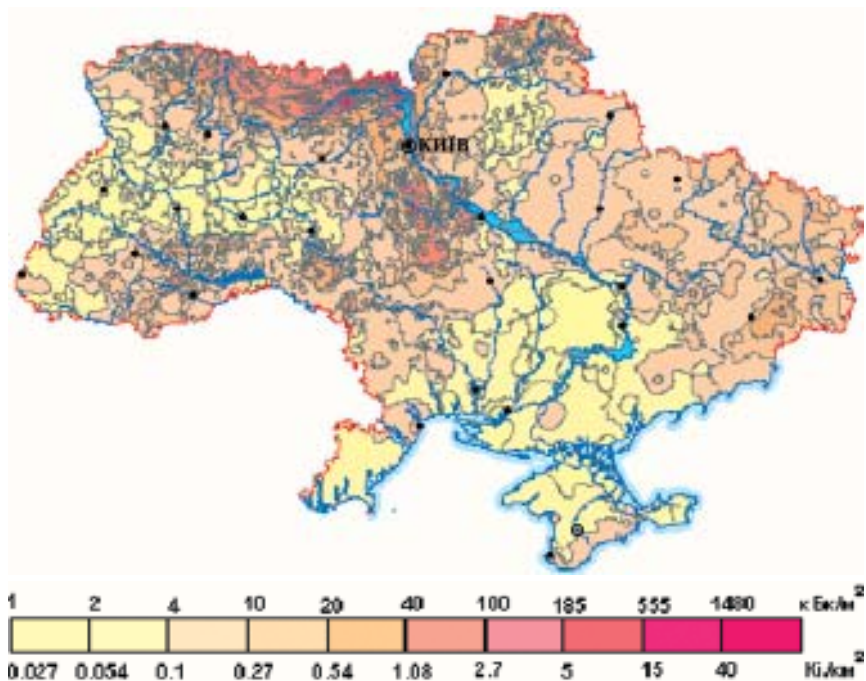


Рисунок 1.3.1. Загрязнение территории Украины цезием-137 (глобальное + “чернобыльское”) по состоянию на 01.01.1998 г.

В Киевской, Черкасской и северо-западной части Кировоградской областей южный след имеет непрерывное распространение и преимущественные уровни загрязнения до 100 кБк·м⁻² (до 2,7 Ки·км⁻²) при наличии пятен с загрязнением до 185 кБк·м⁻² (до 5 Ки·км⁻²). В других из названных выше областей цезиевое загрязнение имеет пятнистый характер с преобладающими плотностями 10÷40 кБк·м⁻² (0,3÷1,1 Ки·км⁻²).

От южного следа в западном направлении прослеживается пятнистая полоса загрязнения, которая охватывает части Винницкой, Хмельницкой, Тернопольской, Ивано-Франковской и Черновицкой областей. Преобладающими здесь являются уровни загрязнения 10÷40 кБк·м⁻² (0,3÷1,1 Ки·км⁻²) при наличии отдельных участков с загрязнением до 100÷150 кБк·м⁻² (2,7÷4 Ки·км⁻²).

Существенные загрязнения цезием-137 отмечены также в западной и северо-восточной частях Черниговской области (до $185 \text{ кБк}\cdot\text{м}^{-2}$), северной части Сумской области, а также Донецкой, Луганской, Харьковской областях (в основном, до $40 \text{ кБк}\cdot\text{м}^{-2}$).

Повышение фонового уровня за счет загрязнения цезием-137 до $4\div 20 \text{ кБк}\cdot\text{м}^{-2}$ (до $0,1\div 0,5 \text{ Ки}\cdot\text{км}^{-2}$) отмечается в пределах большей части Украины. Территории в Западной Украине (Львовская, частично Тернопольская, Закарпатская, Хмельницкая области и прилегающие к ним районы других областей), в Южной Украине (Херсонская, часть Запорожской, Днепропетровской, Николаевской, Одесской областей) характеризуются уровнями загрязнения цезием-137 ниже $4 \text{ кБк}\cdot\text{м}^{-2}$.

По данным мониторинга на территорию Украины, которая занимает около 6 % площади всей Европы, приходится около 14 % цезия-137, выброшенного во время аварии. Пространственный анализ распределения этого радионуклида по территории Украины свидетельствует, что почти 40 % от его суммарного количества (без учета радиоактивных отходов, захороненных в Зоне отчуждения) радиоцезия в Украине находится в пределах 100-километровой зоны вокруг ЧАЭС, что составляет немногим больше 3 % территории страны.

В отличие от многочисленных карт загрязнения цезием-137 картографических материалов по другим долгоживущим радионуклидам Чернобыльского выброса – стронция-90 и трансурановых элементов, таких, как плутоний-238, америций-241 и др. – значительно меньше. Такое положение обусловлено рядом причин, среди которых – отсутствие возможности определения этих радионуклидов дистанционным способом, а также высокая стоимость соответствующих радиохимических анализов проб почвы на содержание стронция и трансурановых элементов.

С целью устранения отмеченного недостатка и построения соответствующих карт был впервые выполнен в 1989-90 гг. для 30-километровой зоны ЧАЭС массовый анализ проб почвы на стронций и трансурановые элементы [4]. Уровни загрязнения стронцием-90, в основном, хорошо коррелируют с загрязнением цезием-137. Наиболее интенсивное загрязнение отмечено на западном следе (в направлении на Толстый Лес). Максимальные плотности загрязнения, за $2\div 5 \text{ км}$ от ЧАЭС, достигают $1800\div 3700 \text{ кБк}\cdot\text{м}^{-2}$ ($50\div 100 \text{ Ки}\cdot\text{км}^{-2}$), при удалении до 30 км они понижаются до $40\div 1500 \text{ кБк}\cdot\text{м}^{-2}$ ($1\div 40 \text{ Ки}\cdot\text{км}^{-2}$) (рис. 1.3.2).

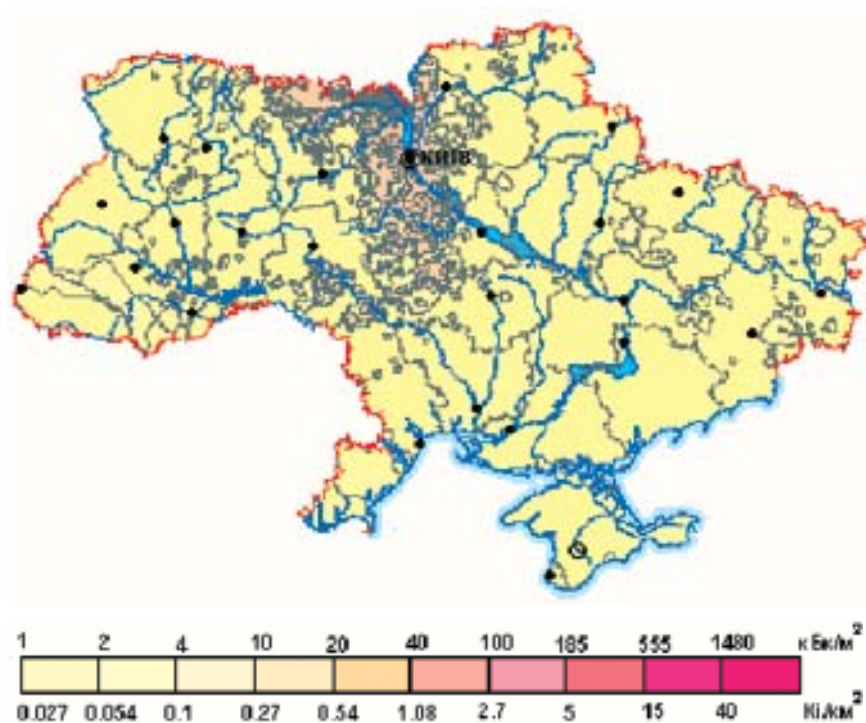


Рисунок 1.3.2. Загрязнение территории Украины стронцием-90 (глобальное + “чернобыльское”) по состоянию на 01.01.1998 г.

Для территорий, находящихся за пределами 30-километровой зоны, наиболее высокие плотности загрязнения стронцием-90 обнаружены в Киевской области [4], где около 1 тыс. км² имеют плотность загрязнения > 111 кБк·м⁻² (> 3 Ки·км²); около 1,5 тыс. км² – 37÷111 кБк·м⁻² (1÷3 Ки·км²); 3,5 тыс. км² – 18,5÷37 кБк·м⁻² (0,5÷1,0 Ки·км²); еще на 10,3 тыс. км² плотность загрязнения составляет 5,55÷18,5 кБк·м⁻² (0,15÷0,5 Ки·км²).

На втором месте по уровню загрязнения стронцием-90 находится Житомирская область, где его максимальные значения достигают 37÷74 кБк·м⁻² (1,0÷2,0 Ки·км²) на площади около 200 км², а около 4,5 тыс. км² характеризуются плотностью загрязнения от 5,6 до 37 кБк·м⁻² (0,15÷1,0 Ки·км²).

Повышенные уровни содержания стронция-90 в почве наблюдаются также в некоторых районах Черниговской и Черкасской областей.

Общая площадь угодий на территории страны, где плотность загрязнения стронцием-90 превышает $5,5 \text{ кБк}\cdot\text{м}^{-2}$ ($0,5 \text{ Ки}\cdot\text{км}^{-2}$), составляет около 27,5 тыс. км^2 .

Как уже было отмечено выше, в целом загрязнение стронцием-90 формировалось по тем же закономерностям, что и цезия-137. Но, учитывая то, что стронций относится к тугоплавким элементам второй щелочной группы таблицы Менделеева, химическое состояние его в момент выброса и поведение в почвах отличаются от поведения цезия-137. Стронций-90 был выброшен из реактора, в основном в составе матрицы топливных частиц, что обусловило его низкую миграционную способность в первые годы после аварии. Со временем, в процессе их диспергирования и выщелачивания началось увеличение количества доступного для обменных процессов стронция-90 в почве, что в результате привело к повышению содержания радионуклидов в растениях в зоне загрязнений.

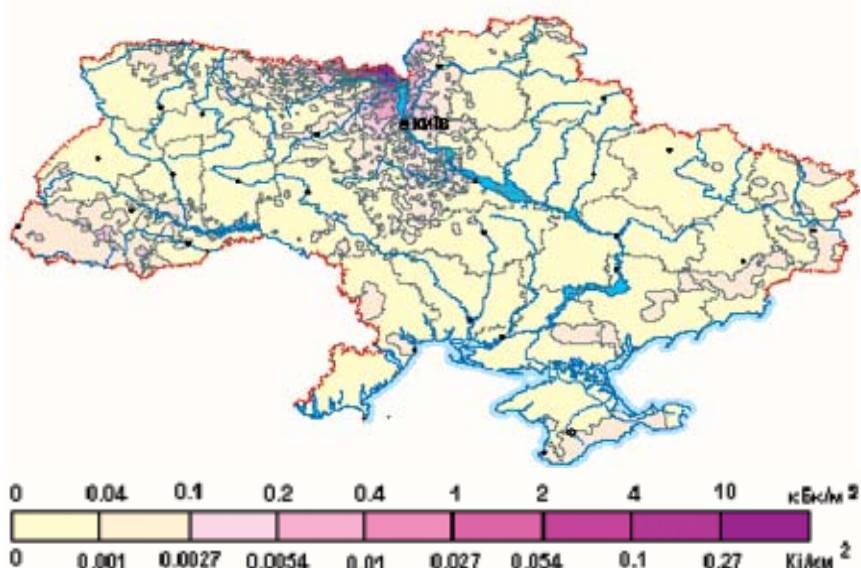


Рисунок 1.3.3. Загрязнение территории Украины изотопами плутония (глобальное + “чернобыльское”) по состоянию на 01.01.1998 г.

Повышенные концентрации трансурановых элементов, продуктов деления ядерного топлива и их распада в объектах окружающей среды были обнаружены практически на всей территории Украины. В каждой из областей образовались большие поля с плотностью загрязнения радионуклидами $40 \div 300 \text{ Бк} \cdot \text{м}^{-2}$ ($0,0001 \div 0,0008 \text{ Ки} \cdot \text{км}^{-2}$), что в 4-5 раз превышает доаварийный фон. Длительный (в течение 10 суток) выброс радионуклидов из разрушенного 4-го блока ЧАЭС при изменяющихся метеорологических условиях и физико-химических процессах в реакторе, разнообразие форм рельефа и разная степень “шероховатости” поверхности почвы, обусловленная природными и антропогенными причинами, разные микроклиматические условия в итоге обусловили формирование чрезвычайно сложных полей радиоактивного загрязнения по конфигурации и активности, радионуклидному составу и химическим формам выпадений.

Наиболее загрязненной является часть Зоны отчуждения, расположенная в пределах 10-километрового удаления от ЧАЭС (рис. 1.3.4-1.3.6).

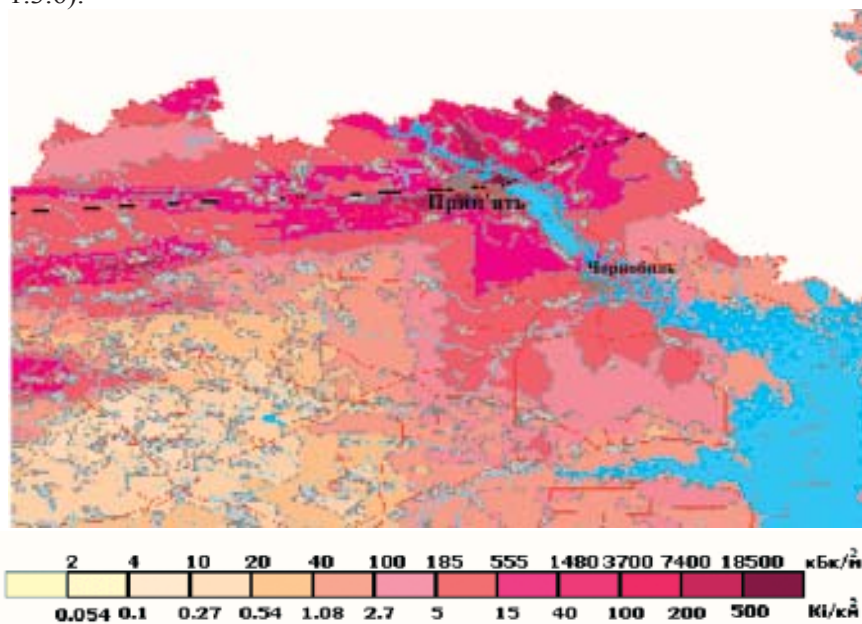


Рисунок 1.3.4. Загрязнение территории Зоны отчуждения цезием-137 на 01.01.1998 г.

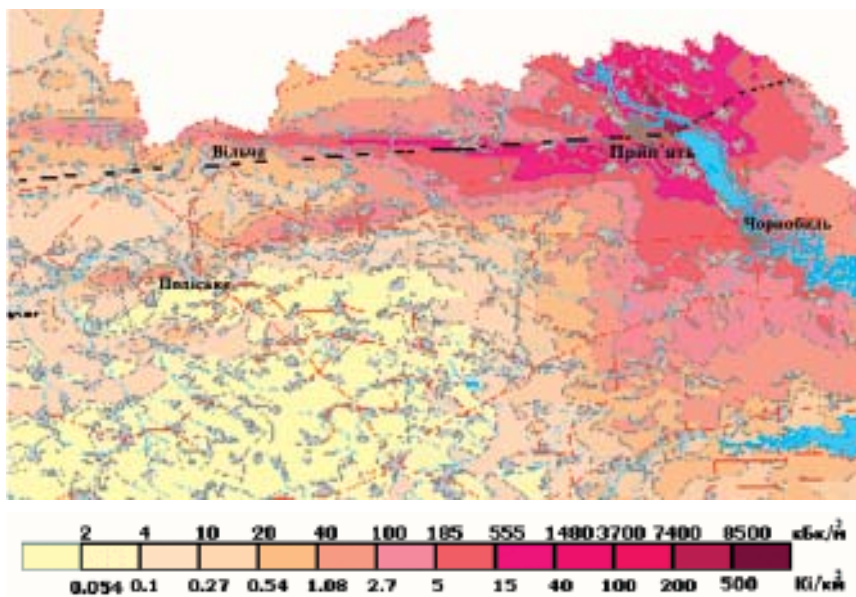


Рисунок 1.3.5. Загрязнение территории Зоны отчуждения стронцием-90 на 01.01.1998 г.

Зона отчуждения – это территория Украины, максимально загрязненная радионуклидами аварийного происхождения и выведенная из народнохозяйственного оборота в соответствии с Законом Украины “О правовом режиме территории, подвергшейся радиоактивному загрязнению вследствие Чернобыльской катастрофы” [5]. В 1986 году с ее территории было эвакуировано население. Площадь зоны составляет 2,044 тыс. км² и включает два города (Припять и Чернобыль) и 74 сельских населенных пункта.

Опасность проживания на загрязненной территории определяется не столько уровнем загрязнения, как величиной дозы облучения, формируемой радионуклидами почвы и поступающими в организм местных жителей с компонентами диеты.

Зона Украинского Полесья, где преобладают земли с лугово-болотными, торфяно-болотными, дерново-подзолистыми, песчаными и супесчаными почвами характеризуется повышенной биологической доступностью аварийных радионуклидов и миграционной способностью в биологических цепочках. На черноземных почвах Винницкой,

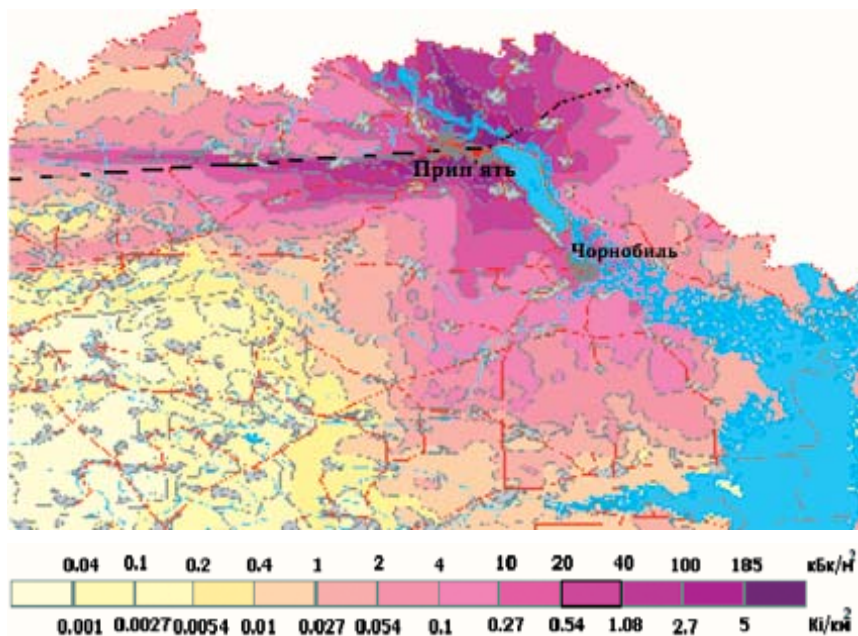


Рисунок 1.3.6. Загрязнение территории Зоны отчуждения изотопами плутония на 01.01.1998 г.

Черкасской, некоторых районов Киевской области радионуклидное загрязнение в растениях незначительное. Различие коэффициентов перехода, например, радиоцезия, на загрязненных территориях достигает трех порядков: наименьшие значения характерны для глинистых черноземов, наибольшие – для болотных, кислых почв.

Так называемые “горячие частицы”, которые обнаруживались практически на всех загрязненных территориях и вызывали опасения не только у населения, но и среди специалистов, несмотря на высокую активность, оказались в результате их незначительной растворимости в воде и биологических жидкостях наименее опасными среди возможных источников внутреннего облучения человека.

Радиоактивное загрязнение водных ресурсов

Основными дозообразующими радионуклидами остаются до настоящего времени стронций-90 и цезий-137. Мониторинговые

исследования последних лет показали, что наиболее значимым источником радиоактивного загрязнения вод Днепровских водохранилищ являются поверхностные стоки стронция-90 (он более подвижен) и цезия-137 с загрязненных территорий ближней зоны ЧАЭС, а также фильтрующие воды из водоема-охладителя и подтопленных территорий. Суммарный вклад подземной составляющей стока в радиоактивном загрязнении рек не превышал нескольких процентов ежегодного поверхностного смыва радиоактивности с водосборов.

Основной вклад в современное загрязнение всей Днепровской водной системы оказали радиоактивные выпадения первых недель после аварии. Спустя 10 лет после аварии в донных отложениях водохранилищ Днепра суммарное содержание цезия-137 оценивалось величиной $4,5 \div 5,2$ тыс. Ки, а стронция-90 – около 1,5 тыс. Ки. Вынос радионуклидов речной сетью зависит от погодных условий, размеров паводков и половодий. В целом, на фоне скачкообразных изменений содержания радионуклидов в водах р. Днепр наблюдается устойчивая тенденция снижения их загрязнения цезием-137 и стронцием-90 во времени. К тому же, именно водохранилища Днепровского каскада явились основным барьером, не допустившим существенного распространения радиоактивных стоков из зоны ЧАЭС за счет очень высоких темпов их седиментационного и биологического очищения.

В целом наибольший суммарный вклад в загрязнение речных вод вносит загрязнение тех частей площади водосбора, которые активно участвуют в формировании их стока. Из таких локальных участков, вносящих значительный вклад в загрязнение речных вод стронцием-90, выделяется территория поймы р. Припять вблизи ЧАЭС. Реализованный комплекс мероприятий, направленный на уменьшение выноса радионуклидов, естественные барьеры и процессы на пути их миграции приводят к тому, что содержание цезия-137 и стронция-90 в воде р. Днепр в районе г. Киева на один-два порядка ниже действующего гигиенического норматива ($2 \text{ Бк} \cdot \text{л}^{-1}$) [6] по каждому из радионуклидов.

Радиоактивное загрязнение подземных вод, используемых для водоснабжения населения, изучалось в пределах зоны влияния промышленности и хозяйственной инфраструктуры г. Киева, в населенных пунктах вблизи Чернобыльской Зоны отчуждения. В грунтовом водоносном горизонте, залегающем на глубинах в основном от 2 до 15 метров, по данным определений в пробах, отобранных в колодцах и скважинах,

загрязнение воды цезием-137 достигало $0,01 \div 0,08$ Бк·л⁻¹. Это подтвердило незначительность вклада воды в суммарную дозу облучения.

Загрязнение сельскохозяйственной продукции

При загрязнении сельхозугодий радионуклидами наиболее критической отраслью является молочное скотоводство. В 1987-1989 годах в наиболее загрязненной Житомирской области доля молока с превышением допустимого содержания 370 Бк·л⁻¹ (ВДУ-88) [7], в период пастбищного содержания скота, достигала $13 \div 14$ %, в стойловый – $7 \div 8$ %; в Ривненской, Киевской, Черниговской – соответственно $1 \div 3$ % и $0,1 \div 0,6$ %. Для улучшения обстановки, сложившейся в производстве молока, в первую очередь были выведены из оборота угодья с плотностью загрязнения выше 555 кБк·м² (15 Ки·км²). С той же целью в коллективном секторе был проведен комплекс агромелиоративных мероприятий, дифференцированный по уровням загрязнения заготавливаемых кормов. Для частного сектора было принято решение о выделении населению улучшенных пастбищ при одновременном запрете выпасать скот на неокультуренных пастбищах.

В итоге, начиная с 1993 года молоко с превышением временно допустимого уровня 370 Бк·л⁻¹ (ВДУ-91), [8], перестало поступать из коллективных хозяйств. В индивидуальных крестьянских хозяйствах Ривненской, Волынской, Житомирской областей проблема получения “чистой” продукции и сегодня остается актуальной, поскольку агро-мелиоративные мероприятия, проведенные в общественном секторе животноводства, трудно реализуемы в условиях природных и полуприродных экосистем, являющихся единственной кормовой базой частного сектора Полесского региона.

Потребление сельскими жителями загрязненных территорий молока местного производства приводит к значительному поступлению радионуклидов в организм и формированию высоких доз внутреннего облучения. На рисунке 1.3.7 представлено частотное распределение удельной активности цезия-137 в молоке, производимом в индивидуальных хозяйствах сельских жителей территорий Украины, относящихся к зоне повышенного радиационного контроля.

Медианное значение удельной активности составляет 45 Бк·л⁻¹ при наблюдаемом логнормальном распределении частот повторяемости значений. Доля молока, загрязненного цезием-137 свыше

допустимого уровня, равного, в соответствии с Государственными гигиеническими нормативами, принятыми в Украине в 1997 г, $100 \text{ Бк} \cdot \text{л}^{-1}$ [6], составляет 22,1 %.

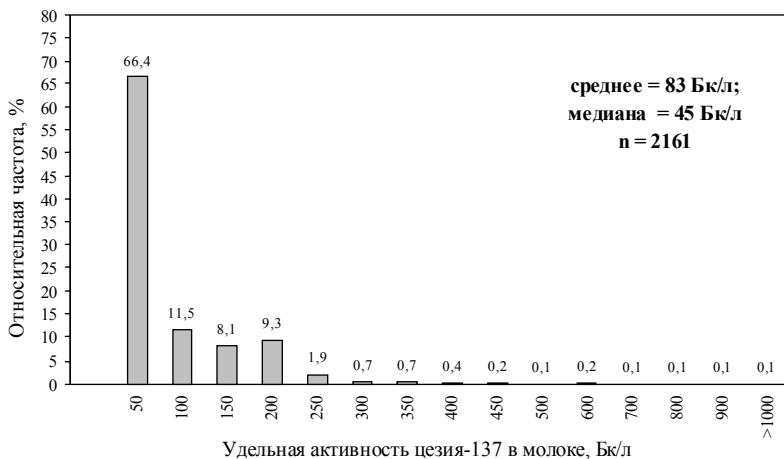


Рисунок 1.3.7. Частотное распределение усредненных по населенным пунктам значений удельной активности цезия-137 в молоке, производимом в индивидуальных хозяйствах Украины в 1999 г. [20].

В связи с высоким уровнем радиоактивного загрязнения животных, поступающих на мясоперерабатывающие предприятия, в начале 1987 года была разработана и внедрена технология трехстадийного заключительного откорма крупного рогатого скота с использованием “чистых” кормов. Кроме того, на мясоперерабатывающих предприятиях с помощью специально разработанных приборов начали использовать методику прижизненной оценки содержания радионуклидов в мышечной ткани животных. Это позволило исключить убой загрязненного скота без предварительного содержания на “чистых” кормах. В итоге количество мяса, загрязненного выше допустимого уровня (который в соответствии с ВДУ-91 составлял для цезия-137 $200 \text{ Бк} \cdot \text{кг}^{-1}$) резко сократилось и в настоящее время на мясоперерабатывающие предприятия оно не поступает.

Содержание радионуклидов в растениях в первый послеаварийный год являлось результатом их поверхностного загрязнения. В мае 1986 г. основным загрязнителем был короткоживущий йод-131 [9]. К

середине лета того же года загрязнение растительности определялось уже в основном цезием-137, -134. В таблице 1.3.1 приведены средние значения содержания радиоактивных загрязнителей некоторых видов овощной продукции в Полесском районе [9].

Таблица 1.3.1. Удельная активность радионуклидов в овощной продукции местного производства в Полесском районе, лето 1986 г.

Вид овощной продукции	Суммарная бета-активность, Бк·кг⁻¹	Удельная активность изотопов цезия, Бк·кг⁻¹	Доля радиоцезия, %
Картофель	370	185	50
Помидоры	260	220	85
Укроп	200	180	90
Яблоки, груши	810	740	90

ГЛАВА 1.4. Дозы облучения

Дозы облучения населения Украины

Загрязнение окружающей среды радионуклидами привело к дополнительному облучению населения Украины.

Мерой воздействия радиационного фактора на здоровье людей является суммарная доза (внутреннего и внешнего) облучения.

Основные источники длительного радиационного воздействия на человека – гамма-излучающие радионуклиды, выпавшие на почву (внешнее гамма-облучение) [5, 7], а также радиоактивные изотопы цезия и стронция, поступающие в организм с радиоактивно-загрязненными продуктами питания (внутреннее облучение).

За время с момента аварии на ЧАЭС накоплен большой массив научных данных, разработаны новые методы расчета, модели ретроспективного восстановления и прогноза доз облучения населения [10-16].

Согласно последним оценкам [12], коллективная эффективная доза жителей Украины, которые пострадали вследствие аварии на Чернобыльской АЭС, за период с момента аварии по 1996 г. составляет около 47,5 тыс. чел.·Зв (без учета дозы облучения щитовидной железы радионуклидами йода). При этом более 95 % этой дозы составляет доза от цезия-137, около 5 % – от стронция-90 и доли процента от плутония (табл. 1.4.1).

Таблица 1.4.1. Структура доз облучения сельского населения, усредненная по всем населенным пунктам, которые находятся в зоне радиационного контроля

Исследования [10] показали, что вклад стронция-90 в суммарную дозу внутреннего облучения постепенно увеличивается, что обусловлено увеличением доли этого радионуклида в почве, доступного

для усвоения растениями. В 1994 г. наибольший вклад достиг 6 % у взрослых и 16 % у детей, которым на момент аварии исполнился 1 год. Величина дозы облучения населения трансурановыми элементами в десятки – сотни раз ниже величин доз облучения, которые население получит за счет радионуклидов цезия-137 и стронция-90 на протяжении 70 лет после аварии.

Доза внешнего облучения составляла существенный вклад в суммарную дозу первые два года после аварии. Ее величина и динамика изменения определялись плотностью загрязнения территорий радиоцезием и его радиоактивным распадом. Изменение коллективной дозы внутреннего облучения носило иной характер. Факторами, определяющими дозу внутреннего облучения, были параметры перехода радионуклидов в цепочках “почва-растения” и “почва-молоко”, а также структурой рациона питания жителей загрязненных территорий. В настоящее время внутреннее облучение остается доминирующей компонентой суммарной аварийной дозы облучения для большинства населения загрязненных территорий.

Основную часть дозы внутреннего облучения формирует излучение цезия-137, поступающего в организм людей с продуктами питания.

Источник внутреннего облучения	Вклад в дозу внутреннего облучения, %
Вода	1
Воздух	1
Продукты питания, в т.ч.:	98-99
Молоко	71-76
Мясо	7
Овощи	7
Другие	9

Согласно [17], структура суммарной коллективной эффективной дозы облучения населения, проживающего на загрязненных

территориях Украины, оценивается следующим образом: внутреннее облучение – 65 %, внешнее – 35 %.

Среди людей, получивших дозы облучения от аварийных источников излучения, различают две наиболее многочисленные группы: ликвидаторы (принимавшие непосредственное участие в ликвидации последствий аварии на ЧАЭС) и население (пребывавшее или проживающее на радиоактивно загрязненных территориях). Для обеих групп на сегодняшний день разработаны специальные подходы к оценке полученных и ожидаемых доз облучения, в зависимости от местонахождения людей во время аварии или ликвидации последствий аварии, радионуклидного спектра, времени пребывания в зоне радиоактивного загрязнения, особенностей питания, уклада жизни и т.д.

Дозы облучения ликвидаторов

Национальный Регистр Украины, сформированный после аварии, насчитывает 175 тыс. ликвидаторов [17], из которых 126 тыс. – это ликвидаторы 1986 – начала 1987 годов, получившие наибольшие дозы облучения. Средние дозы облучения ликвидаторов 1986-1987 годов по данным Регистра, составляют 120÷180 мЗв. Существующие данные описываются логнормальным законом распределения, притом, что достоверность этих данных не очень велика и требует дальнейшего уточнения. Для приближенной оценки коллективной дозы, полученной ликвидаторами, были изучены, систематизированы и проанализированы “маршрутные” листы, усовершенствованы методы ретроспективного восстановления доз. Было получено, что коллективная поглощенная доза для участников ликвидации последствий аварии Чернобыльской катастрофы в 1986-1987 годах оценивается значением 16 тыс. чел·Гр.

К сожалению, в Национальном Регистре Украины среди ликвидаторов 1986-1987 гг. только 22 % имеют персональные дозы облучения. Среди ликвидаторов указанной группы поглощенные дозы 250 мГр и выше могли получить 6-15 % человек, а выше 500 мГр – более половины из них [10].

По данным отдела Чернобыльской АЭС, который занимался восстановлением доз облучения работников станции, участвовавших в аварийных работах, численность персонала, находящегося на

дозиметрическом учете Чернобыльской АЭС, составляла 3500 чел. Средняя индивидуальная поглощенная доза облучения оценена в 97 мГр. Численность персонала, который принимал непосредственное участие в ликвидации аварии (26-30 апреля), равна 600 человек, средняя индивидуальная поглощенная доза, рассчитанная для этой когорты, составляет 406 мГр. По причине острого облучения погибли 18 человек (средняя индивидуальная доза 6250 мГр) [11]. Коллективная доза аварийного облучения персонала АЭС за 1986 год составила 980 чел.·Гр, а с учетом погибших работников – 1086 чел.·Гр. С учетом приведенных данных коллективная доза 126 тысяч участников аварии оценивается значением около 40 тыс. чел.·Гр.

Дозы облучения жителей, эвакуированных из 30-километровой зоны

Жители г. Припять были эвакуированы через 36 часов после начала аварии на ЧАЭС. За это время в городе сформировалось поле внешнего гамма-облучения, которое в свое время было детально изучено. На основе этих данных впоследствии была разработана процедура оценки полученных индивидуальных дозовых нагрузок [13-15, 18]. Статистический анализ рассчитанных индивидуальных доз внешнего облучения 12632 человек, эвакуированных из г. Припять, показал, что их значения подчиняются логнормальному закону распределения. По расчетам, 95 % жителей г. Припять получили дозу не выше 24 мЗв. При этом средняя доза составляет 10 мЗв, медиана – 8,9 мЗв [16].

Эвакуация сельских жителей 30-километровой зоны длилась до середины мая. Дозы внешнего облучения этой группы населения в начале оценивались исключительно за время пребывания в 30-километровой зоне. Таким образом, среднее значение эффективной дозы внешнего облучения за предэвакуационный период (по результатам анкетирования 25 % эвакуированного населения) составило 16 мЗв. При этом у 1260 лиц этой группы дозы были выше 50 мЗв, а у 120 лиц – выше 100 мЗв. Большой коэффициент вариации полученных статистических данных (142 %) объясняется существенными отличиями мощности дозы в разных селах 30-километровой зоны, разной продолжительностью пребывания населения в 30-километровой зоне, а также тем индивидуальным для каждого жителя временем, которое он провел на открытом воздухе.

Для эвакуантов из г. Припять суммарная эффективная доза облучения (без учета облучения щитовидной железы) за счет ингаляции оказалась в 2 раза выше внутренней дозы облучения. Для сельских жителей, эвакуация которых началась позднее (через 10-15 дней), внутреннее облучение могло превышать внешнее в 2-4 раза.

В целом можно констатировать, что средние дозы внешнего облучения жителей г. Припять за 36 часов, предшествовавших эвакуации, могли составлять 10-12 мЗв, эвакуированных жителей г. Чернобыля – 20 мЗв, для эвакуированных из сел 30-километровой зоны – 20-30 мЗв, хотя, как утверждают авторы [18], за счет внутренней компоненты эти оценки могут быть удвоены. Кроме того, согласно расчетам [19], эвакуанты, в зависимости от реализованного маршрута эвакуации, могли получить дополнительную дозу внутреннего облучения, сравнимую с дозой предэвакуационного периода.

Литература

1. United Nations. Ionizing radiation: sources and biological effects. UNSCEAR, UN, New York, 1982.
2. Морозов В.В., Константинов Е.А., Филиппов Е.М. Исследование расположения ТСМ, состояния помещений и систематизация данных по помещениям объекта “Укрытие”. Отчет ВНИПИЭТ № 2669 от 10.12.90 г. – Ленинград. – 267 с.
3. Довідник з агрохімічного та агроекологічного стану ґрунтів України/ За редакцією Носко Б.С., Прістера Б.С., Лободи М.В. та ін. – К: Урожай, 1994.
4. Атлас Чорнобильської зони відчуження / За ред. В.М. Шестопалова. Картографія, – К.: 1996.
5. Лихтарев И.А., Ковган Л.Н. Общая структура чернобыльского источника и дозы облучения населения Украины // Междунар. журнал радиац. медицины. – 1999. – Т. 1 (1). – С. 29-38.
6. Нормы радиационной безопасности НРБ-76/87 и Основные санитарные правила ОСП-72/87. М.: Энергоатомиздат, 1988.
7. Мьск К., Prühl G., Meckbach R., Likhtarev I., Kovgan L., Golikov S. A new approach to Assess the Doses to the Population in the 30-km Zone after the Chernobyl Accident // Report IRPA. – 2000. – V. – 12-3. – P. 11-257.
8. Про правовий режим території, що зазнала радіоактивного забруднення внаслідок Чорнобильської катастрофи. Закон України. Відомості Верховної Ради (ВВР). – 1991. – № 16. – с. 198.
9. Шесть лет после аварии на ЧАЭС. Основные закономерности изменения радиационной обстановки и ее прогноз. /И.П. Лось, Г.В. Федосенко, И.Ю. Комариков и др. // Информ. бюл. УНЦРМ МЗ и АН Украины. – 1992. – 1, вып. 2. – С.93-151.
10. Chumak V., Sholom S., Pasalskaya L. Application of high precision EPR dosimetry with teeth for reconstruction of doses to Chernobyl populations // Radiation Protection Dosimetry. – 1999. – V. 84. – P. 515-520.
11. Десять лет после аварии на Чернобыльской АЭС, Национальный доклад Украины. – Минчернобыль. – К., 1996. – 250с.
12. Васильченко А.В., Носовский, С.В. Показатели облучаемости персонала ЧАЭС за 1986 г. Радиационная и экологическая безопасность предприятий ядерного топливного цикла / Под ред. С.В. Барбашева, Украинское ядерное общество, Одесса, 1995. – 5с.
13. Чумак В.В., Баханова Е.В., Мусияченко Н.В., Шолом С.В., Пасальская Л.Ф. Дозиметрия ликвидаторов через 14 лет после Чернобыльской аварии: проблемы и достижения // Межд. журн. радиац. медицины. – 2000. – №1 (5). – С. 26-45.

14. Chumak V., Bondarenko A. Analysis of dosimetric data of The National liquidator registry of Ukraine. The IRPA Regional symposium on Radiation Protection in neighbouring countries of central Europe, September 8-12, Prague, Proceedings, P. 394-397.
15. Chumak V.V., Krjuchkov V.P. Problem of Verification of Chernobyl Dosimetric Registries. Proceedings of the 1998 ANS Radiation Protection and Shielding Division Topical Conference Technologies for the New century, April 19-23, 1998, Sheraton Music City, Nashville, Tennessee, USA, V. 1, P. 545-552
16. 15 років Чорнобильської катастрофи. Досвід подолання. Національна доповідь України. –К., 2001. –143 с.
17. Buzunov V., Omelyanetz N., Strapko N. Chernobyl NPP consequences cleaning up participants in Ukraine health status epidemiologic study main results/ The radiological consequences of the Chernobyl accident, Proceedings of the first international conference, Minsk, Belarus, 18-22 march 1996, 871 p.
18. Chumak V., Likhtarev I., Sholom S., Meckbach R., Krjuchkov V. Chernobyl Experience in Field of Retrospective Dosimetry: Reconstruction of Doses to the Population and Liquidators Involved into the Accident // Radiation Protection Dosimetry. 1998. –V. 77, P. 91-97.
19. Чумак В.В. Ретроспективна дозиметрія зовнішнього опромінення когорт, що зазнали впливу радіації у гострий період великої комунальної аварії: Дис. д-ра біол. наук: 14.02.01. – К., 2001.
20. Комп'ютеризовані дані для парламентарів та керівників вищої ланки. ENVREG 9602. РР 14 Україна. – Інститут радіаційного захисту АТН України 2000-2001, Інтелектуальні системи ГЕО 2000-2001.

РАЗДЕЛ II. ХРОНИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ МАЛЫХ ДОЗ ИОНИЗИРУЮЩЕЙ РАДИАЦИИ НА ПОЧКИ

А.Ф. Возианов, А.М. Романенко, Antonio Llombart Bosch

На протяжении последней декады нами проводились эпидемиологические, гистологические, иммуногистохимические и молекулярно-генетические исследования различных форм почечно-клеточного рака (ПКР), онкоцитом, перитуморальной почечной ткани у больных с разными дозами инкорпорированного облучения, обусловленного их длительным проживанием на загрязненной радионуклидами территории Украины. Иммуногистохимический анализ и молекулярно-генетические исследования проводились в Отделе Патологии Медицинской школы Университета г. Валенсии, Испания (зав. – профессор Antonio Llombart-Bosh), согласно научного сотрудничества между Институтом Урологии АМН Украины и Отделом Патологии Медицинской Школы Университета г. Валенсия. В работе, кроме того, участвовали кандидат медицинских наук В.Н. Непомнящий (лаборатория Патологии Института Урологии АМН Украины), а с испанской стороны – доктора Луиза Моррел-Квадрени, Хосе-Антонио Лопес-Гуерреро и Антонио Пейин.

Радиометрические измерения ^{137}Cs в суточной моче перед операцией у больных с опухолями почки, проживающих в различных регионах Украины, проводились в Лаборатории Радиозкологии (руководитель – профессор И.П. Лось) Научного Центра Радиационной Медицины АМН Украины.

ГЛАВА 2.1. Экологический патоморфоз почечноклеточного рака у жителей загрязненных радионуклидами регионов Украины

Согласно данным Международного Института эпидемиологии (Rockville, USA) почечноклеточный рак является достаточно распространенной патологией – на его долю независимо от этнических или географических границ приходится около 3 % всех случаев злокачественных новообразований человека [1]. Наиболее высокие уровни заболеваемости ПКР отмечаются в странах Северной Европы и Северной Америки. Так, в середине 90-х годов заболеваемость раком почки, например, в Исландии среди мужчин составляла 13,0, среди женщин – 7,8 на 100 тыс. населения, Германии – 12,2 и 5,5, Финляндии – 11,8 и 6,4, Голландии – 10,3 и 5,3, Швеции – 10,2 и 6,2, в США – 10,3 и 4,9 соответственно, с ежегодным приростом заболеваемости 1,5-3 % [1, 2].

Проведенные в последнее десятилетие мультицентровые эпидемиологические исследования показали, что среди факторов риска развития ПКР большое значение имеют вредные привычки, диетические особенности (избыток жиров животного происхождения, преимущественно мясная диета) [1], заболевания с поражением почек [3], а также влияние неблагоприятных факторов внешней среды и профессиональных вредностей (например, в нефтеперерабатывающей, металлургической и химической промышленности) [4].

В настоящее время в эпидемиологии рака важную роль приобретают факторы антропогенного загрязнения окружающей среды [5, 6, 7,8]. В этом отношении привлекает к себе внимание Украина, значительная часть населения которой уже более 17 лет проживает на загрязненной радионуклидами территории и подвергается воздействию низкодозового ионизирующего излучения. Причем, хорошо известно, что злокачественные новообразования являются одними из основных стохастических эффектов ионизирующих излучений в отдаленном периоде [7]. Например, данные ретроспективного (1958-1987 гг.) анализа заболеваемости лиц, переживших события Хиросимы и Нагасаки, показали достоверное возрастание частоты случаев рака молочной железы и яичников – у женщин, рака щитовидной железы, легких, толстого кишечника, а также мочевыделительной системы – у всего населения. В частности, дополнительный относительный риск развития рака почки на 1 Зв коллективной дозы (ERR_{15v}) составил

0,71 [9]. Кроме того, имеются данные о повышенной канцерогенной эффективности пролонгированного внутреннего облучения низкими дозами, сформированными радионуклидами Чернобыльского “выброса”, с сокращением при этом латентного периода радиационно-индуцированного рака [10].

В этой связи заслуживают внимания данные эпидемиологического отдела Института урологии АМН Украины, согласно которым за последнее десятилетие темп прироста заболеваемости ПКР в загрязненных радионуклидами регионах (ЗРР) существенно превышает аналогичный показатель по Украине в целом (95 и 59,6 % соответственно) [6].

Выяснению характера и механизмов отмеченной тенденции, основываясь на представлениях о патоморфозе, могут способствовать наряду с эпидемиологическими, также и морфологические, в том числе иммуногистохимические (ИГХ), методы. В частности, представляется целесообразным исследование у больных ПКР из ЗРР некоторых прогностических маркеров – пролиферативного клеточного ядерного антигена (PCNA), онкопротеинов c-erbB-2 (HER-2/неу) и K-ras (p21^{ras}). Показано, что ИГХ-экспрессия каждого из этих маркеров в опухоли больных ПКР обратно связана с их выживаемостью [11, 12, 13].

Вышеизложенное подчеркивает актуальность исследований, направленных на изучение тенденции и особенностей заболеваемости раком почки населения загрязненных радионуклидами областей Украины с выявлением морфологических особенностей опухолевой ткани больных ПКР.

Заболеваемость ПКР изучалась с учетом пола в пяти загрязненных радионуклидами областях Украины (Житомирская, Киевская, Ривненская, Черкасская и Черниговская области), условно сгруппированных в отдельный регион. Сравнение полученных данных проводилось не только между ними, но в сопоставлении с данными в целом по стране и г. Киеву. Исследование охватывает десятилетний период (1989-1998 гг.), 1999 год служил контролем оценки прогноза. Динамическая характеристика заболеваемости осуществлялась на основании анализа общепризнанной системы показателей: абсолютных величин, интенсивных коэффициентов, рассчитанных на 100 тыс. населения; а также абсолютного прироста, темпа роста и темпа прироста показателя заболеваемости. Они позволяют судить о величине изменений

и установить факт колебания уровня заболеваемости ПКР. Учитывая, что сведения о ретроспективной заболеваемости не могут претендовать на абсолютную достоверность, поскольку подвластны влиянию многих факторов (методика сбора, уровень медицинского обслуживания, уровень квалификации специалистов и т.п.), при эпидемиологическом анализе использовался метод наименьших квадратов, который позволяет нивелировать случайный характер отдельных колебаний показателей и выявить тенденцию изменений [14].

Изучались образцы опухолевой ткани 417 больных ПКР в возрасте от 18 до 79 лет (средний – 56 лет). Всем пациентам выполнена радикальная нефрэктомия в период 1993-2000 гг. в клиниках Института урологии и нефрологии АМН Украины и университета г. Валенсии. Украинских пациентов распределили на три группы: из “чистых” регионов Украины (контрольная), загрязненных радионуклидами регионов Украины (согласно данным сборника дозиметрической паспортизации населенных пунктов Украины, 1997) и г. Киева. Группа больных ПКР из г. Валенсии (Испания) была контрольной по отношению к киевской. У 36 пациентов из украинских групп с использованием спектрометрической системы “ADCAM-100” проведены исследования активности ^{137}Cs в суточной моче (на протяжении 1999-2000 гг.). Характеристика групп и результаты радиометрических исследований приведены в таблице 2.1.1.

Таблица 2.1.1. Характеристика больных ПКР и результаты радиометрических исследований активности ^{137}Cs в суточной моче

* – $F=3,96$ ($P<0,05$).

При гистологическом исследовании учитывали прогностически значимые признаки ПКР – категорию T системы TNM, степень злокачественности, наличие участков саркомоподобного роста опухоли, а также клеточный вариант ПКР [15].

Результаты ИГХ-реакции оценивали с учетом интенсивности и распространенности иммуноокрашивания, а также индекса иммунореактивности (для PCNA) – % окрашенных ядер опухолевых клеток в нескольких полях зрения при увеличении $\times 200$, содержащих не менее 1000 клеток. Полученные результаты обработаны статистически с использованием ANOVA и критерия χ^2 .

Результаты эпидемиологического анализа свидетельствуют о ежегодном увеличении в Украине числа случаев с впервые установленным диагнозом ПКР. При различном темпе прироста, колебания которого в течение времени наблюдения находилось в пределах от 1,7 до 14,2 %, количество больных в 1998 г. составило 3771, что на 56,3 % превышает их число в 1989 г. Следует отметить, что больше половины из них приходится на мужчин и количество их постепенно возрастает. Подтверждается это данными темпа прироста (61,0 %, против 49,7 % – среди женщин, оба пола – 56,3 %). Результаты абсолютного значения одного процента прироста среди обоих полов – 24,1 (в отдельности для мужчин – 14,2, для женщин – 9,9).

Что касается непосредственно заболеваемости ПКР населения ЗРР, то его доля возросла с 12,6 % в 1989 г. до 15,0 % в 1998 г. Наибольшее число случаев ежегодно регистрируется в Киевской, Черкасской и Черниговской областях. Однако, за счет более высокого темпа прироста Житомирская область может изменить ситуацию в дальнейшем. Преимущество мужчин, которых на 30 % больше, чем женщин, также может не сохраниться. Ежегодное увеличение среди заболевших удельного веса женщин в четырех областях (за исключением Черниговской) позволяет предположить, что соотношение по полу будет постепенно уравниваться. Указанная особенность характерна для ЗРР и является противоположной ситуации по Украине в целом. Конкретные данные показателей представлены в таблице 2.1.2.

Таблица 2.1.2. Динамика впервые зарегистрированных случаев ПКР в загрязненных радионуклидами областях, г. Киеве и Украине в целом (1989-1998 гг.)

Материалы таблицы 2.1.3, где представлены основные результаты, свидетельствуют о росте заболеваемости ПКР как по Украине в целом, так и в каждой из пяти “скомпрометированных” областей и г. Киеве. Как оказалось, десять лет назад уровень заболеваемости в них не превышал усредненный показатель по стране. В 1998 г. эти величины (за исключением Житомирской области) были уже выше, а среди областей наиболее высокими показателями отличались Черниговская и Черкасская.

Тем не менее, наибольшее внимание привлекает разница темпов прироста показателя. Во всех областях он значительно превышает средний по стране, при этом особенно выделяются Житомирская и Черниговская области. Следует подчеркнуть, что темп прироста заболеваемости среди женщин, практически повсюду существенно выше, чем темп прироста среди мужчин. Полученные данные совпадают с представленными ранее результатами анализа абсолютных

величин заболеваемости и подтверждают возможность изменений ранговых мест областей по уровню заболеваемости. В большей мере это касается Житомирской области, которая с последнего места переместится на более высокое. Характер изменений по г. Киеву подчиняется общей тенденции, однако темп этого процесса здесь самый низкий по сравнению с другими административными территориями, которые вошли в исследование. Анализ динамических рядов позволил установить наличие значительных колебаний показателей заболеваемости в пределах областей и между ними в течение лет наблюдения. Как известно, они отражают особенности эпидемиологических процессов, зависят от разнообразных социальных и биологических факторов и могут влиять на характер общей тенденции. Это потребовало определения трендовых, систематических изменений, что было выполнено с помощью соответствующих методических приемов. Как видно на рисунке 2.1.1 заболеваемость представляет собой неуклонно возрастающую линию, что подтверждает положения, которые были сформулированы на основании анализа реальных ретроспективных интенсивных показателей. Более того, совпадает тенденция развития процесса, которая установлена по абсолютным и относительным числам.

Таблица 2.1.3. Динамика уровня заболеваемости ПКР населения загрязненных радионуклидами областей, г. Киева и Украины в целом (1989-1998 гг.)

Административные территории	Оба пола				Мужчины				Женщины			
	З ₁₉₉₈ ¹	АП ²	ТР ³	ТП ⁴	З ₁₉₉₈	АП	ТР	ТП	З ₁₉₉₈	АП	ТР	ТП
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Житомирская обл.	6,6	4,1	264,0	164,0	7,7	4,0	208,1	108,1	5,5	3,9	343,8	243,8
Киевская обл.	7,6	2,9	161,7	61,7	9,4	3,2	151,6	51,6	6,1	2,8	184,8	84,8
Ривненская обл.	7,6	3,0	165,2	65,2	9,9	2,8	139,4	39,4	5,5	3,1	229,2	129,2
Черкасская обл.	8,1	4,0	197,6	97,6	10,0	4,3	175,4	75,4	6,6	3,9	244,4	144,4
Черниговская обл.	9,0	4,9	220,0	120,0	12,8	7,4	237,0	137,0	5,8	2,7	187,1	87,1

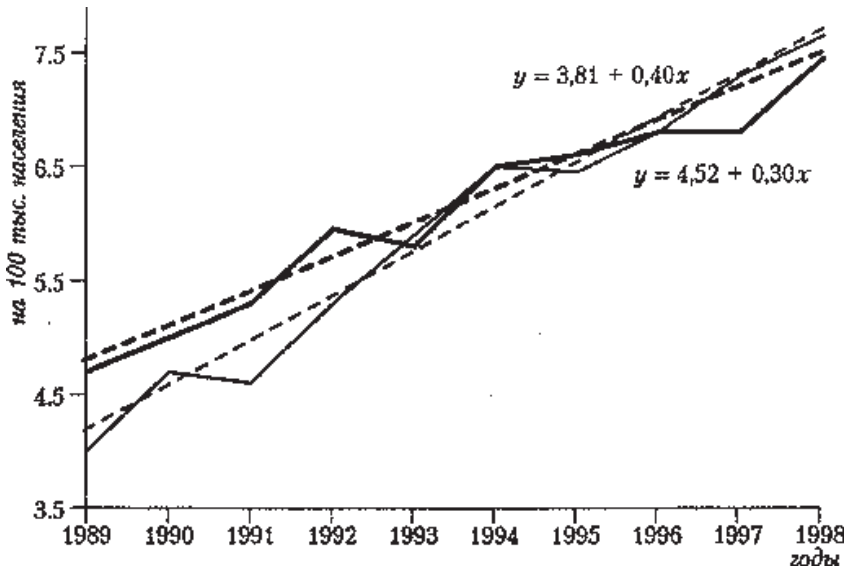


Рисунок 2.1.1. Заболеваемость ПКР за 1989-98 гг. населения загрязненных радионуклидами областей Украины: сплошные линии – статистические данные; пунктирные – расчетные; тонкая линия – ЗРР; жирная – Украина.

Полученные в процессе работы постоянные величины исходного уровня, а также ежегодного прироста, могут служить инструментом, с помощью которого определяются прогностические показатели. Так, через три года уровень заболеваемости ПКР среди населения

загрязненных радионуклидами областей и в целом по Украине при условии сохранения нынешней ситуации можно ожидать таким:

в Житомирской области	– 8,86
в Киевской области	– 8,34
в Ривненской области	– 8,32
в Черкасской области	– 9,66
в Черниговской области	– 9,63
в целом по загрязненным радионуклидами областям	– 9,01
по г. Киеву	– 12,23
по Украине	– 8,42

О дееспособности методики расчета прогноза и надежности, полученных таким образом данных, свидетельствуют материалы табл. 2.1.4, в которой сопоставляются показатели заболеваемости по официальным данным и теоретически рассчитанные за 1999 г.

Таблица 2.1.4. Показатели заболеваемости ПКР по официальным данным и теоретически рассчитанные (1999 г.)

Административные территории	ФП ¹	ТРП ²	КО ³
Житомирская обл.	6,9	7,90	14,4
Киевская обл.	7,8	7,76	0,5
Ривненская обл.	7,9	7,7	2,5
Черкасская обл.	9,0	8,72	3,1
Черниговская обл.	7,9	8,73	10,0
г. Киев	10,9	11,3	3,6
УКРАИНА	7,9	7,82	1,0

¹ФП – фактический показатель, на 100 тыс. населения;

²ТРП – теоретически рассчитанный показатель, на 100 тыс. населения;

³КО – коэффициент ошибки, %.

Согласно данным таблицы 2.1.4, прогностические величины близки к “истинным”, а коэффициент погрешности за редким исключением превышает 10 %, что считается минимальным отклонением при составлении прогноза на ближайший период.

Таким образом, полученные данные, в том числе прогностические, свидетельствуют о стойком росте уровня заболеваемости ПКР среди населения Украины и, особенно, в ЗРР, где темп роста и темп

прироста в каждой из пяти областей превышает такие же показатели по стране. Наиболее интенсивный рост наблюдается в Житомирской и Черниговской областях. Следует подчеркнуть, что сейчас уровень заболеваемости выше среди мужчин. Тем не менее, в отличие от данных по Украине, прирост заболеваемости ПКР среди женщин в “скомпрометированных” областях существенно выше, чем среди мужчин, что может повлиять на существующее соотношение. Характер изменений по г. Киеву, подчиняясь общей тенденции, отличается наиболее низким темпом роста заболеваемости по сравнению с другими административными территориями, которые вошли в исследование.

Выявленные эпидемиологические особенности заболеваемости ПКР в ЗРР Украины явились основанием к проведению гистологических исследований опухолевой ткани с изучением прогностически значимых морфологических признаков ПКР у данной категории больных. В таблице 2.1.5 представлены результаты рутинного морфологического исследования. Средние значения и стандартные отклонения размеров опухоли среди украинских и испанских пациентов существенно не отличались и составили соответственно $7,7 \pm 4,9$ и $8,6 \pm 4,4$ см ($P > 0,05$). Сравнительный анализ прогностически значимых морфологических признаков ПКР в изучаемых группах показал статистически достоверное увеличение частоты ПКР высокой степени злокачественности, а также с участками саркомоподобного роста, у больных из ЗРР и г. Киева (табл. 2.1.5). Следует отметить, что выявленная особенность сохранялась и при сравнении попарно групп больных из “чистых” регионов и ЗРР ($\chi^2 = 7,9$, $P < 0,05$), а также среди пациентов из гг. Киева и Валенсии ($\chi^2 = 13,0$, $P < 0,005$). В то же время, по клеточному варианту ПКР и T-категории системы TNM значимых отличий в исследуемых группах не выявлено (табл. 2.1.5).

Учитывая полученные результаты изучения гистологических критериев злокачественности, большой интерес вызывают данные ИГХ-исследований. Так, изучение ИГХ-экспрессии протеина PCNA показало, что среди украинских и испанских пациентов позитивными оказались соответственно 83 и 69 % случаев. При этом установлено достоверное увеличение индекса PCNA в опухоли больных ПКР из ЗРР и г. Киева (табл. 2.1.6). В то же время, выявлена зависимость уровня экспрессии PCNA от степени злокачественности ПКР ($F = 3,2$, $P < 0,05$). В

связи с чем, был проведен сравнительный анализ экспрессии PCNA в исследуемых группах с учетом степени злокачественности, показавший наличие значимых различий между группами для низких ее степеней (1-я степень – $\chi^2= 18,0, P< 0,01$; 2-я степень – $\chi^2= 12,8, P< 0,05$), но не для высоких (3/4-я степени – $\chi^2= 7,2, P> 0,05$). Тем самым наши данные, с одной стороны, подтверждают известный факт о прямой связи индекса PCNA и степени злокачественности ПКР [12], а с другой – свидетельствуют о возрастании пролиферативной активности клеток опухоли у больных ПКР из ЗРР и г. Киева при низких степенях злокачественности, с утратой или маскировкой такой зависимости при высоких.

Таблица 2.1.5. Морфологическая характеристика опухолевой ткани – у больных ПКР в исследуемых группах

Показатель	“Чистые” регионы (n=94)	ЗРР Украины (n=90)	г. Киев (n=133)	г. Вален- сия (n=100)
Категория Т (система TNM)¹:				
Т1	45 (48%)	49 (54%)	68 (51%)	39 (39%)
Т2	26 (28%)	28 (31%)	45 (34%)	34 (34%)
Т3-4	23 (24%)	13 (15%)	20 (15%)	27 (27%)
Клеточный вариант²:				
Конвенционный	67 (72%)	61 (68%)	89 (67%)	67 (67%)
Папиллярный	16 (17%)	13 (14%)	21 (16%)	16 (16%)
Хромобобный	5 (5%)	7 (8%)	10 (7%)	3 (3%)
Собирательных протоков	2 (2%)	3 (3%)	5 (4%)	3 (3%)
Недифференцированный	4 (4%)	6 (7%)	8 (6%)	11 (11%)
Степень злокачественности³:				
1 – $\chi^2=10,0 (P<NS)$	15 (16%)	17 (19%)	22 (17%)	19 (19%)
2 – $\chi^2=6,9 (P<NS)$	61 (65%)	41 (46%)	45 (34%)	54 (54%)
3/4 – $\chi^2=29,4 (P<10^{-4})$	18 (19%)	32 (35%)	66 (50%)	27 (27%)
Наличие участков⁴ саркомоподобного роста⁴	$\chi^2=13,7 (P<0,005)$ 16 (17%)	25 (28%)	38 (29%)	11 (11%)

Таблица 2.1.6. Результаты ИГХ-исследований опухолевой ткани у больных ПКР в исследуемых группах

Показатель	“Чистые” регионы	ЗРР Украины	г. Киев	г. Валенсия
Индекс PCNA ¹ , %	14,1	21,8	27,6	6
CI ₉₅ , %	6,8-21,4	15,7-27,9	23,2-32,0	3,3-8,7
K-ras (+) ²	10 (38 %)	20 (59 %)	71 (59 %)	38 (38 %)
c-erb-B2 (+) ³	5 (29 %)	25 (66 %)	17 (33 %)	не исслед.

¹ – F=7,7 ($P < 10^{-4}$);

² – $\chi^2=12,2$ ($P < 0,01$);

³ – $\chi^2=11,5$ ($P < 0,005$)

Не менее интересные данные получены при ИГХ-исследовании в опухолевой ткани больных ПКР экспрессии онкопротеинов K-ras и c-erb-b-2. Так, иммуноэкспрессия K-ras была позитивной среди украинских пациентов в 56 % случаев, среди испанских – в 38 %; c-erb-b-2 – в 44 % случаев среди украинских пациентов (в испанской группе экспрессию c-erb-b-2 не исследовали). Анализ распределения частот положительной K-ras- и c-erb-b-2-иммунореактивности выявил достоверное увеличение этих показателей у пациентов, проживающих в г. Киеве и ЗРР (табл. 2.1.6).

Экспрессия K-ras, также как и уровень экспрессии PCNA, оказалась зависимой от гистологических особенностей ПКР, показав строгую связь низкой K-ras-иммунореактивности с конвенционным вариантом, в отличие от других форм ПКР ($\chi^2= 13,5$, $P < 0,0005$). В то же время, ни K-ras- или c-erb-b-2-иммуноэкспрессия не была зависима от степени злокачественности ПКР ($\chi^2= 4,8$, $P= 0,19$ и $\chi^2= 2,0$, $P= 0,58$ соответственно), что совпадает с данными многих авторов о независимой прогностической ценности этих маркеров при ПКР [11, 13].

Таким образом, результаты морфологических исследований свидетельствуют, что у больных ПКР, длительное время проживающих на загрязненных радионуклидами вследствие Чернобыльской катастрофы территориях Украины и г. Киеве, наблюдается комплекс прогностически неблагоприятных признаков. Последние складываются из возросшей частоты случаев ПКР высокой гистологической степени злокачественности, повышенной пролиферативной активности клеток опухоли, а также гиперэкспрессии онкопротеинов K-ras и c-erb-b-2.

Хорошо известно, что в условиях воздействия хронического низкодозового ионизирующего излучения у жителей ЗРР наибольшую опасность представляет внутреннее облучение [5, 7], на 90-98 % обусловленное инкорпорацией ^{137}Cs , основным путем экскреции которого является почечный (более 90 %). В этой связи, с учетом данных проведенного нами на протяжении 1999-2000 гг. спектрометрического исследования активности ^{137}Cs в суточной моче больных ПКР, показана правомерность распределения пациентов на изучаемые группы (с достоверно различным уровнем экскреции ^{137}Cs – см. табл. 2.1.1). И это тем более важно, поскольку ионизирующее излучение, в том числе низкодозовое, является действующим фактором на всех этапах канцерогенеза (инициации/промоции/прогрессии) [16], а экспериментальные данные последних лет свидетельствуют о повышенной канцерогенной эффективности ионизирующего излучения именно “Чернобыльского выброса” [10]. Вместе с тем, в ЗРР Украины наряду с низкодозовым ионизирующим излучением, представлен целый ряд других антропогенных факторов внешней среды, в частности химической природы [5], что предполагает возможность потенцированного канцерогенного эффекта. Тем более что загрязнение экосистемы Украины многими химическими факторами во много раз выше, чем в развитых странах, например, США – в 6,5 раза, ЕЭС – в 3,2 [8]. Поэтому, выявленная в ходе проведенных исследований неблагоприятная тенденция роста заболеваемости ПКР в ЗРР с изменением биологии опухоли у больных ПКР убедительно свидетельствует об экологическом патоморфозе ПКР в Украине после Чернобыльской катастрофы.

Также следует отметить, что прогностически неблагоприятные – K-ras- и c-erbB-2-позитивные случаи ПКР, связанные с высокой вероятностью развития метастазов [11,13], в то же время предполагают возможность первоочередного использования у данной категории больных противоопухолевых препаратов нового поколения. В частности, основанных на ингибции ras-прениляции – запрещении конвертации биологически неактивного цитоплазматического предшественника онкопротеина ras в зрелую форму [17, 18], а также рекомбинантных гуманизованных моноклональных антител к онкопротеину c-erbB-2, селективно взаимодействующих с его внеклеточным доменом (препарат trastuzumab) [19]. В этой связи, актуальными являются

исследования ИГХ-экспрессии онкопротеинов K-ras и c-erbB-2 в опухолевых клетках, что кроме прогностической информации, в ближайшем будущем, вероятно, позволит расширить рамки использования этих маркеров до реального клинического значения – как критериев отбора пациентов с метастатическим ПКР для эффективной противоопухолевой терапии.



Фото 1. Группа исполнителей научного проекта, касающегося проблем рака почки в Украине (слева - направо): **Professor Antonio Llombart-Bosch, Dr. Luisa Morell-Quadreny, академик Алина Романенко, Dr. Jose-Antonio Lopez-Guerrero.**

ГЛАВА 2.2. Сопоставительный анализ гистологических особенностей и пролиферативной активности почечноклеточного рака и онкоцитом почки у больных после аварии на ЧАЭС

Настоящее исследование поставило целью изучить гистологические особенности почечноклеточного рака, а также зоны рака *in situ* (CIS) в ткани почки за пределами опухоли в зависимости от разного уровня инкорпорированного облучения, прооперированных в два различных периода после аварии на ЧАЭС. Контрольную группу составили аналогичные больные с почечноклеточным раком (ПКР), отобранные в Валенсии (Испания). Всего изучено 348 больных после радикальной нефрэктомии по поводу опухоли без предварительного лечения. 236 больных с Украины были прооперированы в Институте урологии (г. Киев) и в зависимости от длительности радиационного воздействия были разделены на 5 (I-V) групп. Контрольная VI группа включила 112 таких же больных, которых прооперировали в Госпитале университетской клиники г. Валенсия. Характеристика всех больных представлена в таблице 2.2.1.

Таблица 2.2.1. Характеристика пациентов

	Группа I		Группа II		Группа III		Группа IV		Группа V		Группа VI	
	М	Ж	М	Ж	М	Ж	М	Ж	М	Ж	М	Ж
Кол-во пациентов	30	27	30	25	43	29	11	3	22	16	74	38
Средний возраст	55 (27-79)		56 (34-75)		55 (18-77)		51 (27-75)		53 (41-75)		57 (26-77)	
Года операций	1993-1999		1993-1996		1997-1999		1993-1996		1997-1999		1975-1989	
Уровень радиационного загрязнения почвы (Ки/км ²) ¹	НЗ ²		0,5-5		0,5-5		5-30		5-30		НЗ ²	

¹ – Данные радиационного загрязнения почвы взяты из [20];

² – НЗ: незагрязненные радионуклидами территории.

Во всех случаях макроскопически определялись размеры опухоли. Почечноклеточный рак классифицировался соответственно клиническим и гистологическим критериям, выделенным Гейдельбергской UICC классификацией [15].

Микроскопический анализ включал все опухоли, в сочетании с перитуморальной тканью, полученной лишь у 167 украинских и 85 испанских больных. Однако детальный гистологический и иммуногистохимический анализ перитуморальной ткани представлен в отдельной главе.

Стадия опухоли (TNM) и некоторые патологические особенности ПКР и перитуморальной ткани в анализируемых группах суммированы в таблице 2.2.2.

Таблица 2.2.2. Распространенность клинических и патологических параметров ПКР и перитуморальной ткани почки в разных группах пациентов

Группы	Кол-во случаев ¹	Стадия TNM				Гистологический тип ²						Градация			Саркоматоидные изменения	Изменения в перитуморальной ткани почки ³			
		I	II	III	IV	1	2	3	4	5	6	1	2	3		1	2	3	4
I	57	28	17	7	5	39	13	-	-	4	1	8	37	12	12	32	3	33	27
II	55	31	16	6	2	37	7	3	3	2	3	8	20	27	11	33	4	45	35
III	72	36	27	6	3	40	11	5	2	9	5	12	23	37	25	55	9	49	63
IV	14	7	5	1	1	10	1	1	-	-	2	3	8	3	4	10	1	9	10
V	38	21	11	6	-	18	6	1	1	8	4	10	16	12	10	30	6	22	37
VI	112	43	38	14	17	67	16	3	3	12	11	21	59	32	11	8	1	97	-
Статистическая достоверность		$\chi^2=7,22$, pns				$\chi^2=27,2$, pns						$\chi^2=29,6$, p<0,005			$\chi^2=12,4$, p<0,001				

¹ – количество случаев указано;

² – 1 – конвенционный; 2 – папиллярный; 3 – хромофобный; 4 – собирательных протоков; 5 – онкокитома; 6 – другие;

³ – 1 – ядерная атипия; 2 – CIS; 3 – воспаление; 4 – радиационная нефропатия.

Среднее и стандартное отклонения при характеристике размеров опухоли составляли 7,7 и 4,9 см для украинских и 8,6 и 4,4 см для испанских больных соответственно. Сравнительный анализ между украинскими и испанскими больными выявил более частую

распространенность наиболее высокой степени ядерной атипии у украинских больных, особенно преобладающую у больных II и III группы. Статистический анализ выявил идентичное распределение опухолей по степени ядерной атипии в I и VI группах, по сравнению с II, III, IV и V группами больных.

Интересно отметить, в ПКР у украинских больных была более высокая распространенность саркоматозных изменений (метаплазии), особенно в группах III, IV и V. При этом статистически достоверными были различия между I и II группами. Однако, в отношении саркоматозной трансформации, I и II группы достоверно отличались от контрольной VI испанской группы ($\chi^2=4,99$; $p<0,05$). Перитуморальная воспалительная реакция у украинских больных была слабее и встречалась реже, чем в испанской группе.

Существенные различия между украинскими и испанской группами выявлялись в отношении ядерной атипии в эпителии коркового и мозгового вещества, а также рака *in situ*. Преимущественно медуллярная ядерная атипия в эпителии собирательных трубочек (протоков) чаще всего встречалась в III, IV и V группах и значительно реже – в I и II группах. Точно так же зоны рака *in situ* чаще встречались в III и V группах и проявляли статистически достоверные различия по отношению к другим группам.

Радиационно-подобные поражения, особенно выраженные в медулле и менее ярко в корковой перитуморальной ткани, обнаруживались только у украинских больных (табл. 2.2.2). Микроскопически они выявлялись в коре в виде радиационной склерозирующей пролиферативной атипической нефропатии с выраженным пикнозом ядер эпителиальных клеток проксимальных и дистальных канальцев. Кроме того, в корковом веществе определялись очаговые поля дистрофии и некроза с гломерулярными изменениями, напоминающими мембранозную нефропатию. При этом в медулле обнаруживались обширные поля пикнотически измененных эпителиальных клеток в собирательных трубочках, с отслоением их от базальной мембраны, дегенерацией, регенерацией и десквамацией с последующим образованием крупных широких “оголенных” (без эпителия) полостей, напоминающих “дырки в сыре”. Необходимо отметить, что описанная выше радиационная нефропатия чаще встречалась в III и V украинских группах больных.

Проллиферативный клеточный ядерный антиген (PCNA) выявлялся в 151 и 78 опухолях, что составляло 83 и 69 % всех новообразований из Украины и Испании, соответственно. При этом частота выявления PCNA положительных опухолей в I украинской и контрольной испанской группах больных была идентичной. Украинские группы III и V отличались наиболее высокой экспрессией PCNA в ядрах опухолевых клеток. Кроме того, наиболее высокая иммунореактивность PCNA отмечалась в опухолях с наиболее высокой степенью атипии. Достоверные различия выявлялись между украинскими больными с наличием канальцевой ядерной атипии и/или рака *in situ* в перитуморальной почечной ткани, где уровень экспрессии PCNA был наиболее высоким (в среднем 41,15 %) по сравнению с опухолями без очагов дисплазии в перитуморальной почечной ткани (в среднем 20,85 %).

Протеин онкогена K-ras выявлялся в 101 (56 %) опухолях украинских больных и в 43 (38 %) опухолях из Испании (табл. 2.2.3). Интенсивность окрашивания была преимущественно невысокой, однако его распространенность была высокой (более 50 % окрашенных клеток), особенно в группах III и IV.

Таблица 2.2.3. Распространенность экспрессии PCNA и K-ras в ПКР в разных группах пациентов

	Группы						Стат. анализ
	I	II	III	IV	V	VI	
PCNA (+)	16	43	60	12	20	78	F = 14,66 p < 10 ⁻⁶
Среднее значение	14,1	26,8	28,5	15,4	28,2	6	
Стандартное отклонение	18,9	23,2	26,3	15,3	21	14,6	
K-ras (+)	10	22	49	7	13	43	χ ² = 28,1 p < 0,001
> 50 % окрашенных	6	12	45	7	13	17	
Общее количество	26	55	65	14	20	112	

При выявлении коррелятивной зависимости между экспрессией K-ras и гистологическими формами опухолей почки, высокая достоверность определялась только в конвенционном почечноклеточном раке, в котором K-ras экспрессия была ниже, чем в других почечноклеточных раках (χ²=38,56, p<0,0001). При этом опухоли с канальцевой ядерной атипией и CIS в перитуморальной почечной ткани отличались более высокой K-ras экспрессией, чем опухоли без указанных перитуморальных предопухолевых изменений.

При обсуждении полученных данных обращало на себя внимание то, что по таким критериям, как размеры, стадия и гистологический тип, почечноклеточный рак на Украине и в Испании был одинаков. Распределение по гистологическим типам ПКР в Украине и в Испании было примерно таким же, как в других странах [21, 22]. Статистически достоверные различия между группами ПКР были выявлены в отношении степени ядерной атипии, проценте саркоматоидных изменений, уровне воспалительной реакции в окружности опухоли, а также в перитуморальных повреждениях. Большинство опухолей с высокой степенью (градацией) ядерной атипии встречалось среди украинских больных, хотя среди них между отдельными группами тоже были различия, при этом особенно высокая степень ядерной атипии обнаруживалась у больных, проживающих в загрязненных радионуклидами регионах Украины (независимо от дозы и продолжительности экспозиции). В то время как в опухолях из группы I распределение их по степени ядерной атипии было таким же, как у испанских больных. Саркоматозная метаплазия также чаще встречалась в ПКР из Украины и была наиболее выраженной в III, IV и V группах в сравнении с I и II группами. При этом изменения, вызванные радиационным воздействием, чаще встречались в III и V группах среди украинских больных. В целом, очень важно отметить, что вышеописанные различия в украинских группах ПКР были более значительными у больных с наиболее продолжительным сроком радиационной экспозиции либо более высокой дозой облучения.

Хорошо известно, что опухоли человека различного происхождения характеризуются разными уровнями пролиферативной активности, а поэтому и разными уровнями PCNA, что является важным показателем репликации ДНК [23, 24]. Данные литературы убедительно продемонстрировали, что ядерная экспрессия PCNA коррелирует с цитологическим типом ПКР, степенью ядерной атипии и особенно – клиническим течением и прогнозом [12, 25, 26], однако никто не изучал зависимости между воздействием ИР и экспрессией PCNA. Наша работа показала наличие прямой зависимости между продолжительностью воздействия малых доз ИР, высокой степенью ядерной атипии и высокой экспрессией PCNA во всех группах украинских больных, подтверждая возможное влияние длительного действия малых доз ИР на пролиферативную активность опухолей.

Значение онкогенов и особенно семейства *ras* (*H-ras*, *N-ras*, *K-ras*) в развитии ПКР до настоящего времени не получило четких разъяснений. Последние работы подтвердили активацию *H-ras* и *K-ras* онкогенов в ПКР, что позволяет предположить их участие в почечноклеточном канцерогенезе [27, 28]. Некоторые авторы указывают на то, что амплификация *K-ras* необходима для активации процессов пролиферации, ускоренной прогрессии и повышенной агрессивности ПКР у человека [11, 28, 29]. При этом многие авторы в эксперименте доказали наличие экспрессии различных *gas*-онкогенов в индуцированных ИР опухолях [30, 31, 32], а также в клеточных линиях опухолей человека, где различные представители *ras*-онкогенов проявляли высокую экспрессию, подтверждая, что активация мутаций *gas* поддерживает резистентность опухолей человека к радиотерапии [33].

Очень важно отметить, что наши данные показали твердую зависимость между уровнем развития перитуморальной нефропатии, проявляющейся преимущественно появлением многочисленных очагов эпителиальной ядерной атипии в медулле, и экспрессией *K-ras* в ПКР. Взаимосвязь между умеренно и сильно выраженной радиационной нефропатией с высокой экспрессией *K-ras* в ПКР, подтверждает возможность оценки *K-ras* как одной из мишеней хронического действия малых доз ИР, и подъем экспрессии *K-ras* может служить ранним фактором в развитии почечноклеточного канцерогенеза человека [34, 35]. Значительное возрастание агрессивности и пролиферативной активности опухолей, в сочетании с высокими уровнями в них PCNA и *K-ras* иммунореактивности ПКР в группах II, IV и, особенно, III и V украинских больных выявили прямые корреляции с продолжительностью радиационного воздействия, подтверждая важное значение хронического, но регулярного и постоянного действия малых доз ИР для развития почечноклеточного канцерогенеза.

ГЛАВА 2.3. Радиационная склерозирующая пролиферативная атипическая нефропатия (РСПАН) перитуморальной ткани при почечноклеточном раке

В начале эпохи радиационных исследований почку принято было оценивать как орган низкой чувствительности к радиации, и ее канцерогенному воздействию [36, 37]. Последние обзорные статьи, однако, свидетельствуют в пользу значительной роли радиации в развитии рака почки в эксперименте [38, 39, 40]. Кроме того, описаны более 4 клинических наблюдений развития почечноклеточного рака (ПКР) у людей под действием ионизирующего излучения в условиях применяемой радиационной терапии [41].

В последние 20 лет радиационной безопасности уделяется все больше внимания, особенно в связи с бурным развитием ядерной индустрии и связанными с ней авариями, такими как, например, авария на ЧАЭС.

Прошло уже более 17 лет после этой аварии, но и сейчас около 10 миллионов жителей проживает в загрязненных радионуклидами регионах Украины, Беларуси и России, которые постоянно подвергаются хроническому воздействию малых доз ионизирующего излучения. Необходимо напомнить, что Цезий 137 (^{137}Cs), составляющий 90 % всей инкорпорированной радиоактивности, концентрируется и выводится через почки [42]. За период 1986-1998 гг. заболеваемость злокачественными опухолями у взрослых повысилась с 4,7 до 7,5 на 100000 населения (от 6,0 до 9,8 на 100000 мужского населения и от 3,6 до 5,5 на 100000 женского населения) Украины.

Под термином “малые дозы” (0,1-0,5 Гр) понимают уровень радиации, превышающий фоновый уровень, однако более низкий, чем уровень, вызывающий острый эффект, обычно связанный со смертью клетки [43]. Сегодня хорошо известно, что низкие дозы ионизирующей радиации являются потенциальными мутагенами и промотором в развитии опухоли [44, 45].

Пролиферативный клеточный ядерный антиген (PCNA) играет важную роль в метаболизме нуклеиновой кислоты, в качестве компонента для репликации и репарации клеток. Указанный протеин локализуется в ядре клеток, находящихся в S-фазе клеточного цикла, а также не обязательно в S-фазе у облученных клеток, в которых идут процессы репарации ДНК [24].

Как известно, в норме почка отличается низким уровнем пролиферации, как это отмечалось в прилегающей к почечноклеточной опухоли нормальной почечной ткани, которая на большем протяжении была PCNA-отрицательной и лишь в единичных наблюдениях – выявлялось менее 1 % PCNA-положительных клеток [46].

Онкогены семейства *ras* кодируют группу 21-кДа ассоциированных с мембраной протеинов (p21), которые участвуют в контроле за клеточной пролиферацией. Ras-протеины связывают гуанозин трифосфат (GTP) и гуанозин дифосфат (GDP) и характеризуются природной GTP-азной активностью. Они функционируют как регуляторные протеины G-фазы клеточного цикла, контролирующие клеточную пролиферацию путем регуляции сигналами трансдукции плазматических мембран [47]. Нам не удалось обнаружить литературу по иммуногистохимическому исследованию *ras*-протеинов в нормальной или перитуморальной почечной ткани.

Мы же исследовали гистологические особенности, а также PCNA и K-ras экспрессию в перитуморальной почечной ткани, которые можно было бы трактовать как следствие воздействия ионизирующего излучения на украинское население, проживающее в загрязненных радионуклидами регионах. Мы выделили 3 группы больных с почечноклеточным раком из Украины с разным уровнем инкорпорированной радиации. В качестве контрольной, была исследована аналогичная группа больных с почечноклеточным раком из Испании (табл. 2.3.1).

Таблица 2.3.1. Характеристика пациентов

¹ – Данные радиационного загрязнения почвы (Ки/км²) взяты из Raes et al. (1991);

²НЗ – незагрязненные радионуклидами территории.

В большинстве наблюдений украинских групп больных клубочки часто были увеличены в размерах с некоторым утолщением базальных мембран капилляров, облитерацией их просвета, иногда

содержащие пикнотически измененные клетки, что в целом напоминало мембранозную нефропатию. В канальцевом эпителии коркового вещества обнаруживались многочисленные пикнотически измененные ядра, иногда с эозинофильной цитоплазмой, с очагами дистрофии и дезорганизации. Пикнотически сморщенные клетки встречались и в соединительной ткани. Количество и частота возникновения описанных выше очагов в корковом веществе возрастало от I к III группе (табл. 2.3.2).

Таблица 2.3.2. Распространенность радиационной нефропатии в перитуморальной ткани почки у пациентов украинских групп

Радиационные характеристики	Группы			Статистический анализ
	I	II	III	
Корковое в-во почки				
Пикноз ядер эпителия канальцев	21 (51 %)	38 (56 %)	36 (67 %)	$\chi^2=1,88$, ns
Дегенерация	31 (75 %)	59 (86 %)	50 (90 %)	$\chi^2=4,48$, ns
Утолщение базальных мембран клубочков	10 (24 %)	52 (76 %)	45 (81 %)	$\chi^2=36,96$, $P<10^{-5}$
Собирательные трубочки				
Пикноз ядер	33 (78 %)	67 (97 %)	55 (98 %)	$\chi^2=13,75$, $P<0,01$
Регенерация	34 (80 %)	64 (92 %)	47 (83 %)	$\chi^2=3,8$, ns
Десквамация	31 (73%)	57 (82 %)	49 (87 %)	$\chi^2=3,08$, ns
Расширенные "оголенные" протоки	26 (61 %)	50 (72 %)	45 (80 %)	$\chi^2=4,09$, ns
Интерстиций				
Отек	14 (33 %)	4 (5 %)	10 (17 %)	$\chi^2= 14,26$, $P<0,001$
Склероз	24 (57 %)	50 (72 %)	37 (66 %)	$\chi^2=2,76$,pns
Воспаление	7 (16 %)	26 (37 %)	17 (30 %)	$\chi^2=5,50$, ns

В украинских группах большинство наблюдений отличалось обширными полями пикнотически измененных клеток, а в собирательных трубочках медуллы отмечались дегенеративные, регенераторные процессы в эпителии с последующим его отслоением от базальной мембраны и десквамацией в просвет. Чаще всего пикнотические изменения определялись во II и III, по сравнению с I группой. Гирилянды

десквамированного в просвет собирательных трубочек гиперхромного регенерирующего эпителия обнаруживались в медулле многих наблюдений, при этом местами просвет таких трубочек был очень широким, “оголенным” – лишенным эпителия и пустым, напоминающим “дырки в сыре”.

Кроме того, в большинстве наблюдений II и III групп больных и в значительно меньшей мере I группы, по сравнению с контрольной испанской IV группой, встречались многочисленные зоны тубулярной ядерной атипии как в корковом, так и в мозговом веществе почки. В 19, 29 и 36 % наблюдений канальцы были выстланы резко атипичным, напоминающим карциному *in situ* (CIS), эпителием. В то же время в IV группе подобные изменения в виде ядерной атипии были обнаружены в 8 наблюдениях, из которых одно – соответствовало CIS (табл. 2.3.3).

Таблица 2.3.3. Распространенность перитуморальной эпителиальной ядерной атипии и CIS в различных группах

$$\chi^2=80,8, p<0,001$$

Интерстиций мозгового вещества был отечным и часто очагово склерозирован. Воспалительная инфильтрация встречалась редко. Во многих наблюдениях определялись очаги кровоизлияний, особенно выраженные в мозговом веществе, в котором сосуды были повышенного кровенаполнения и часто встречались ангиоматоидно-подобные сосуды неправильной уродливой формы (рис. 2.3.1).

Необходимо подчеркнуть, что вышеупомянутые изменения в виде утолщения базальных мембран капилляров клубочков, изменения канальцевого эпителия в коре и медулле (дегенерация, десквамация, регенерация и пикноз ядер) в сочетании с отеком и склерозом интерстиция встречались только в украинских группах больных. Мы назвали все эти изменения радиационной нефропатией; выраженность и частота ее выявления повышалась у больных, проживающих на загрязненных радионуклидами территориях Украины (группа II и III).

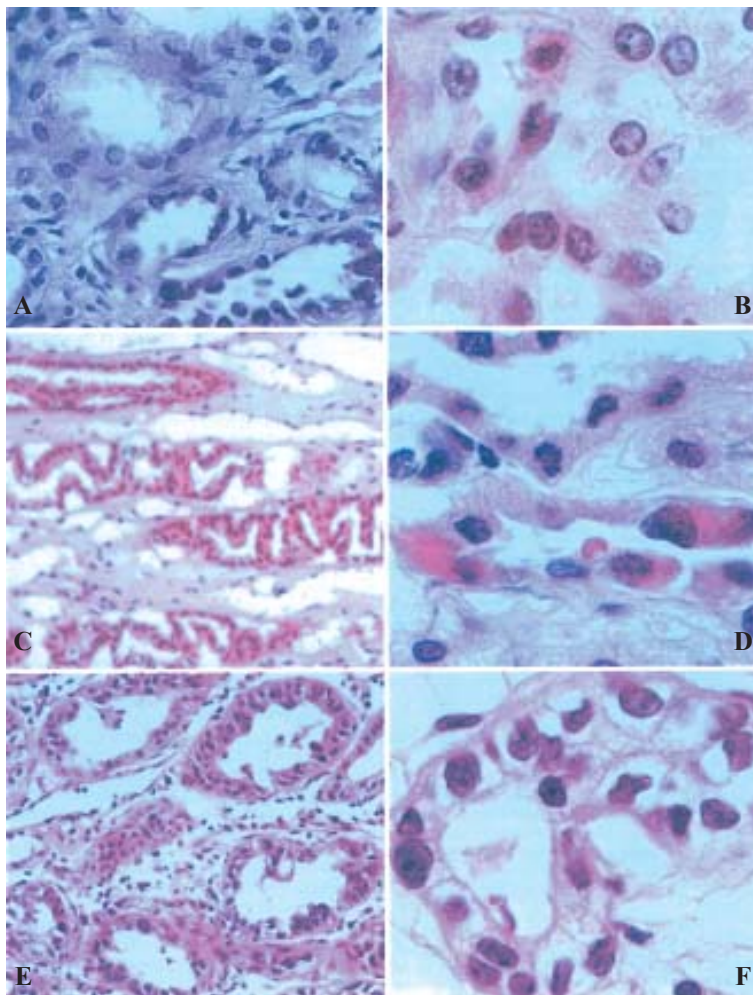


Рисунок 2.3.1. Перитуморальная ткань почки украинских больных, подвергшихся длительному хроническому облучению малыми дозами радиации: А, В – поражение коркового вещества с пикнозом ядер, зонами ядерной атипии и дегенерации канальцевого эпителия; С, D – поражение мозгового вещества с регенерацией и отслоением эпителия собирательных трубочек, гиперваскуляризацией интерстиция, пикнозом и ядерной атипией эпителия; Е, F – Рак in situ в собирательных трубочках.

Окраска гематоксилин-эозином (г-э).

Увеличение: А, Е $\times 230$; С $\times 100$; В, D, F $\times 400$.

Иммуногистохимический анализ 116 наблюдений перитуморальной почечной ткани выявил резкое повышение ядерного PCNA в эпителии проксимальных и дистальных канальцев со средним уровнем распространенности 12, 14 и 15 % окрашенных PCNA ядер тубулярного эпителия в I, II и III группах соответственно, в сравнении с минимальным окрашиванием в IV группе, где лишь в 7 наблюдениях обнаруживалось PCNA окрашивание, в среднем составляющее 1,8 %.

В зонах эпителиальной ядерной атипии и CIS в коре и медулле выявлялось особенно интенсивное окрашивание, которое не определялось в зонах дегенеративно измененного эпителия, а также в десквамированных гирляндах регенерирующего эпителия в медулле (рис. 2.3.2).

Значительное повышение K-ras экспрессии в виде цитоплазматического гомогенного или мембранозного окрашивания в эпителии проксимальных и дистальных канальцев, а также собирательных трубочек в перитуморальной ткани составляло 67, 87 и 85 % в I, II и III группах, соответственно. Процент K-ras-положительных клеток при этом колебался от 25 до 50 % без особых различий между группами. При этом высокий уровень K-ras экспрессии прямо коррелировал с уровнем пикноза ядер и регенераторными изменениями в эпителии канальцев и собирательных трубочек. Сильное, преимущественно мембранозное эпителиальное K-ras окрашивание расширенных собирательных трубочек медуллы с радиационными изменениями обнаруживалось в большинстве наблюдений II и III группы больных. Поля эпителиальной ядерной атипии и CIS часто были K-ras-положительными.

Приведенные выше результаты нашего исследования впервые продемонстрировали, что хроническое, долговременное и постоянное действие малых доз ионизирующего излучения приводит к развитию почечноклеточного канцерогенеза. Наши данные показали резкое повышение распространенности эпителиальной ядерной атипии и CIS в перитуморальной почечной ткани – в корковом и, особенно, в мозговом веществе в сочетании с хронической радиационной нефропатией у больных, проживающих в загрязненных радионуклидами регионах Украины.

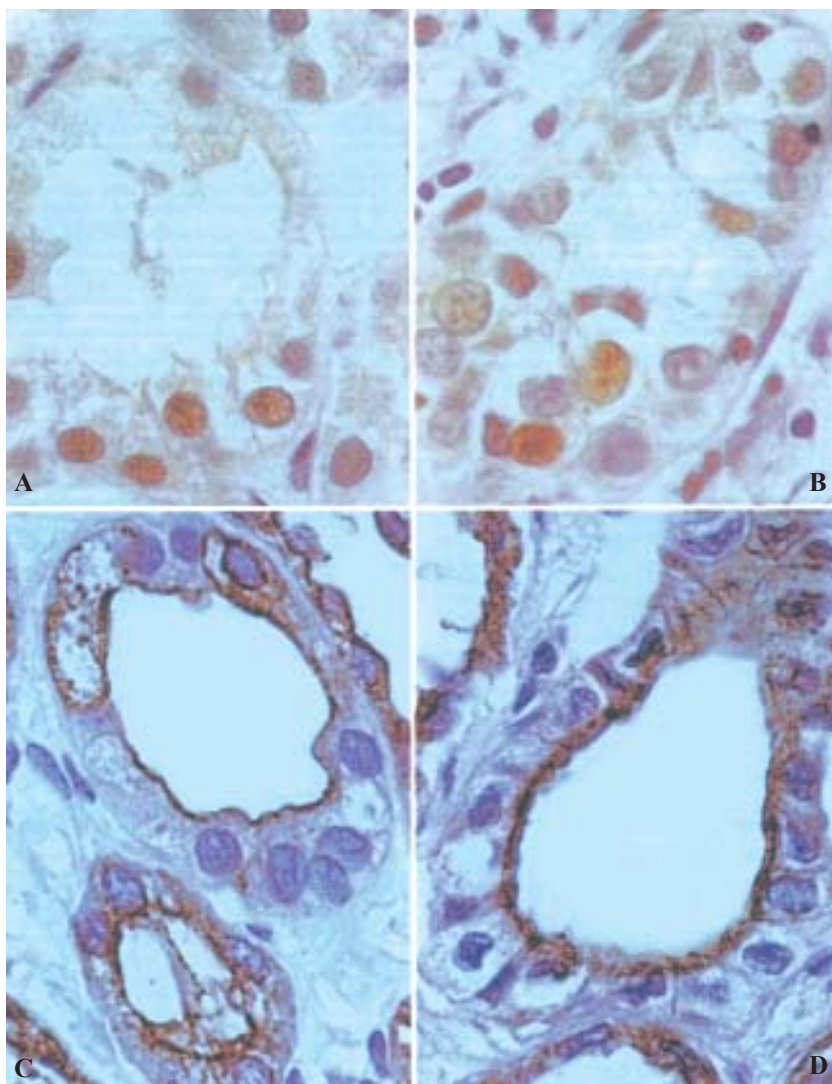


Рисунок 2.3.2. Результаты иммуногистохимического анализа перитубулярной почечной ткани украинских больных, подвергшихся длительному хроническому облучению малыми дозами радиации: А, В – PCNA экспрессия в корковом и мозговом веществе; С, D – Kras экспрессия в эпителии собирательных трубочек. × 400.

Интрагубулярная эпителиальная ядерная атипия при почечно-клеточном раке человека описана недостаточно. Последние работы рассматривают “диспластический” тубулярный эпителий в “нормальной” почке, а также поля *CIS*, встречающиеся при ПКР, как предрак ПКР, однако, по данным этих же авторов, распространенность этих очагов никогда не превышала 23 % у всех ПКР, с преобладанием, главным образом, кортикальных и перигломерулярных повреждений [48, 49, 50]. Нам удалось выделить два типа клеточных повреждений. Первый тип объединил повреждения, напоминающие радиационные, представленные ядерным пикнозом канальцевого эпителия и еще более часто встречающимися повреждениями медуллы, ее собирательных трубочек в виде пикноза ядер, эпителия, его вакуолизации, дегенерации, десквамации, регенерации и пролиферации, а также повреждениями сосудов и интерстиция, что соответствовало понятию радиационной нефропатии. Второй тип повреждений включал эпителиальную ядерную атипию, проявляющуюся скоплениями в канальцах крупных (в 2-3 раза превышающих обычные размеры) ядер с перераспределением хроматина. Первые описания ядерной атипии в почках относились к собирательным трубочкам при ПКР [51]. Однако, в наших наблюдениях развитие перитуморальной ядерной атипии не было связано с гистологическим типом ПКР.

Хорошо известные классические описания острого или хронического воздействия ионизирующей радиации на почку не соответствовали тем изменениям и их патогенезу, которые развивались вследствие длительного (более 17 лет) действия малых доз ИР. Вышеописанную нами хроническую, стойкую радиационную нефропатию с гистологических позиций можно оценивать как склерозирующий пролиферативный атипический нефроз, который обнаруживался у большинства украинских больных, включая I группу. Выявленные в I группе слабо- и умеренно выраженные зоны ядерной атипии в мозговом веществе со слабо- и умеренно выраженными проявлениями радиационной нефропатии в перитуморальной ткани свидетельствуют о том, что так называемые “чистые” регионы Украины являются не очень чистыми, так как земля, вода и пищевые продукты легко могут быть подвергнуты радиационному загрязнению, что уже обсуждалось в наших предыдущих исследованиях [52].

Доминирующие регенераторные и пролиферативные изменения в канальцах и собирательных трубочках при радиационной склерозирующей пролиферативной атипической нефропатии (РСПАН) у украинских больных ассоциировались с резким повышением PCNA и K-ras экспрессии, по сравнению с контрольной группой аналогичных больных из Испании.

Особенно обращало на себя внимание значительное повышение уровня PCNA в ядрах канальцевого эпителия коры и собирательных трубочек медуллы во всех украинских группах (в сравнении с минимальным окрашиванием PCNA в испанской группе больных). Это свидетельствовало не только о высокой клеточной пролиферативной активности, но и подтверждало ведущую роль PCNA в метаболизме нуклеиновой кислоты, как одного из компонентов в механизме репликации и репарации [24].

Роль онкогенов, и особенно *ras* генов (*H-ras*, *N-ras*, *K-ras*), в развитии ПКР до настоящего времени мало изучена. Последние работы, однако, подтверждают факт активации *H-ras* и *K-ras* онкогенов при ПКР, позволяющий подозревать их вовлечение в почечноклеточный канцерогенез [27, 28]. В некоторых работах отмечается важная роль *K-ras* амплификации в процессах пролиферации, а также в активации быстрой прогрессии и агрессивности почечноклеточного рака человека [11, 28, 29]. Многочисленные исследования подтвердили также экспрессию *ras*-онкогенов в радиационно-индуцированных опухолях [53, 54]. По-видимому, хроническое долговременное воздействие малых доз радиации, вызывающее повреждение ДНК с последующей ее репарацией и постоянной хронически действующей пролиферацией эпителия канальцев и собирательных трубочек в перитуморальной ткани у украинских больных, приводит к активации семейства *ras* генов. Выявленная строгая корреляция между экспрессией K-ras протеина в атипичных повреждениях перитуморальной ткани почки в сочетании с повышенной проницаемостью сосудов, кровоизлияниями и хроническим действием ИР на украинских больных подтверждает эту возможность. Последние работы показали выраженную активацию ангиогенеза под действием *K-ras* онкогенов, индуцированных ионизирующей радиацией [38, 55, 56]. Эти работы объясняют изменения проницаемости сосудов медуллы, ассоциированные с экспрессией K-ras в эпителии собирательных трубочек

облученной медуллы перитуморальной почечной ткани украинских больных, имеющее важное прогностическое значение для ПКР [57, 58].

В последние годы появились работы, доказывающие, что основной мишенью, вызывающей стойкую геномную нестабильность, под действием долговременного действия малых доз ИР, является не ДНК, а скорее цитоплазматические мембраны, благодаря продукции в них при оксидативных процессах свободных радикалов [59, 60]. Это означает, что важным индуцирующим звеном не всегда является ДНК, на которую прямо воздействует облучение. В почке, которая относится к тканям “солидного” типа, сложные щелевые межклеточные коммуникации (СЩМК), как оказалось, являются главной мишенью для низких доз ИР [16]. Радиационное повреждение СЩМК, оказываясь, имеет очень важное значение в жизнедеятельности клеток, так как оно предшествует началу синтеза ДНК и стимулирует деление клеток [61]. Интересно также напомнить о потенциальной роли человеческих *ras* онкогенов в подавлении СЩМК между эпителиальными клетками, путем изменения процессов фосфоризации основного щелевого межклеточного протеина [62, 63], а также о роли *ras* протоонкогенов в сигнальной трансдукции, вовлекающих цитоскелет эпителиальных почечных клеток, что в конечном итоге приводит к канцерогенезу и к развитию опухолей более агрессивного фенотипа [64].

В заключение, полученные нами данные выявили строгую зависимость между долговременным действием малых доз ИР на людей, проживающих уже более 17 лет в загрязненных радионуклидами регионах Украины и развитием хронической радиационной нефропатии. Наши данные также подтверждают значение хронического, долговременного действия малых доз ИР, как инициатора, промотора и прогрессора для почечноклеточного канцерогенеза у человека в Украине.

ГЛАВА 2.4. Повреждение генов p15^{INK4B} и p16^{INK4A}, обусловленное оксидативным стрессом в почечноклеточном раке

В последние годы все больше внимания уделяется действию малых доз ИР и его связи с канцерогенезом [65, 66].

Приводятся убедительные данные о том, что хронически действующие малые дозы ИР вызывают в клетках генетическую нестабильность, передающуюся через многие генерации клеток. В свою очередь, такие изменения приводят к развитию мутационных изменений, ответственных за развитие рака [67, 68]. При этом важно подчеркнуть, что генетическая нестабильность возникает, как следствие постоянно действующего радиационного эффекта при дозах от 2 до 4 Гр и даже ниже – при 0,8 Гр [69].

Низкие дозы ИР обладают митогенным действием, а также генерируют через оксидативные процессы свободные радикалы, такие как реактивные формы кислорода (РФК) и оксид азота (NO) либо их производные, которые являются ключевыми факторами в канцерогенезе [70, 71].

Оксид азота (NO), потенциально токсическое вещество со свойствами свободных радикалов, образуется из аргинина с помощью конститутивной или индуцибельной NO синтазы, в результате различных стрессов или повреждений “хозяина”, как, например, под действием X-лучей, гамма-радиации или химических канцерогенов [71, 72]. Индуцибельная NO синтаза (iNOS) активно катализирует реакции, генерирующие пероксинитрит, который вызывает повреждение в виде разрывов цепи ДНК и мутагенез [73].

Другой возможный механизм, обуславливающий рост инициации и промоции при канцерогенезе при оксидативном стрессе, включает способность индуцировать образование простогландинов, катализируемую ферментом циклооксигеназой (COX), который превращает арахидоновую кислоту в простогландины [74, 75]. Наиболее известны два таких энзима: COX1 и COX2. Оба фермента iNOS и COX2, таким образом, являются признанными молекулярными маркерами оксидативного стресса в тканях. Кроме того, COX2, как известно, мгновенно индуцируется в ответ на многочисленные внутри- и внеклеточные стимулы, факторы роста и противовоспалительные цитокины; COX2 может прямо влиять на рост опухолевых клеток, а также косвенно

модулировать опухолевую экспансию, и в частности повышенный потенциал к инвазивному росту [72, 76].

Что касается человеческих генов $p16^{INK4A}$ и $p15^{INK4B}$, всегда тандемно связанных друг с другом, локализующихся на хромосоме 9p21 и относящихся к семейству *INK4*, ингибирующему циклин-зависимые киназы, то они являются уникальными супрессирующими опухолевый рост генами, ответственными за малые повреждения ДНК, кумулирующие, как реостат, эффект этих малых повреждений [77]. В особенности, онкогенный стресс вызывает экспрессию $p16^{INK4A}$ гена, что же касается экспрессии гена $p15^{INK4B}$, то она регулируется негативными факторами роста (например, трансформирующим фактором роста бета – TGF- β) [78].

Подавляющая опухолевый рост активность генов $p16^{INK4A}$ и $p15^{INK4B}$ обусловлена их биохимическими способностями связываться с обоими CDK4 и CDK6, подавляя, таким образом, каталитическую активность CDK4-6/cyclinD энзимный комплекс, необходимый для фосфорилирования протеина ретинобластомы (pRb) и прогрессии клеточного цикла. В результате оба гена $p16^{INK4A}$ и $p15^{INK4B}$ предотвращают E2F-зависимую транскрипцию, блокируя прогрессию клеточного цикла, и в частности, прохождение через G1/S фазы [79]. Многочисленные авторы указывают на инверсионную (обратную) корреляцию между статусами $p16^{INK4A}$ и pRb в первичных опухолях человека [80, 81].

В последние годы появляются новые данные, отмечающие тесную связь между метиляцией в промоторной зоне 5' CpG сайта и транскрипционным блоком $p16^{INK4A}$ гена в различных опухолях человека [82]. Молекулярный анализ $p16^{INK4A}$ промоторной метиляции при плоскоклеточном раке головы и шеи у человека также продемонстрировал высокий уровень его инактивации, коррелирующий с отсутствием иммуногистохимически выявляемой экспрессии $p16^{INK4A}$ протеина [83]. Последующие многочисленные исследования подтвердили важность метиляции $p16^{INK4A}$ в механизме канцерогенеза при опухолях различного типа [79, 84].

Однако, роль повреждения генов $p16^{INK4A}$ и $p15^{INK4B}$ в виде гомозиготной делеции, метиляции или точечной мутации при почечно-клеточном раке у человека остается малоизученной.

Мы попытались определить роль оксидативного стресса в альтерации $p16^{INK4A}$ и $p15^{INK4B}$ генов в почечноклеточном раке у человека

при хроническом, долговременном действии малых доз ИР в зависимости от уровня облучения, стадии TNM и гистологического типа опухолей. С этой целью были выделены три группы почечноклеточного рака среди украинских больных с различным уровнем облучения ИР. Группа I состояла из больных, проживающих в так называемых “чистых” зонах (без загрязнения радионуклидами), группа II включала больных, проживающих в г. Киеве и группа III объединяла больных, проживающих в наиболее загрязненных радионуклидами регионах Украины. Почечноклеточный рак верифицировался согласно последней Гейдельбергской классификации [15].

Данные, полученные в результате гистологического и эпидемиологического анализа, суммированы в таблице 2.4.1, и характеризуют 22 больных (12 мужчин и 10 женщин со средним возрастом 50 лет).

Таблица 2.4.1. Результаты патологических и эпидемиологических исследований

	Группа I	Группа II	Группа III
Количество пациентов	7	7	7
Средний возраст	50 (21-71)	52 (18-70)	48 (41-70)
Уровень радиационного загрязнения почвы (Ки/км ²)	НЗ ¹	0,5-5	5-30
Стадия опухоли			
I	5	2	2
II	2	4	2
III			3
IV		1	1
Гистологический тип			
Конвенционный рак	5	5	5
Папиллярный	1		2
Собирательных протоков	1	1	
Онкоцитомы		1	
Саркоматоидные изменения			
Градация			
Высокодифференцированный		1	
Умеренно дифференцированный	6	3	4
Низкодифференцированный	1	3	4

¹ – Данные радиационного загрязнения почвы взяты из Raes et al. (1991).

Доминирующим был конвенционный рак, диагностированный в 15 наблюдениях с примерно одинаковой распространенностью по

группам. Стадийность и степень зрелости опухолей прогрессивно возрастали у больных, проживающих в загрязненных радионуклидами регионах Украины (группы II и III). Гистологические особенности перитуморальной ткани показывали строгую зависимость между уровнем радиационного облучения и развитием хронической радиационной нефропатии с гистологическими проявлениями склерозирующей пролиферативной атипичной нефропатии, выявленной в 13 (87 %) наблюдениях из II и III групп.

Проведенный нами молекулярный анализ ни в одном наблюдении не выявил гомозиготные делеции в генах *p16^{INK4A}* и *p15^{INK4B}*. Однако, в 5' CpG сайтах промоторной зоны этих генов выявлялась аббернантная гиперметилиция в 7 (32 %) и 5 (23 %) наблюдениях для генов *p16^{INK4A}* и *p15^{INK4B}*, соответственно (рис. 2.4.1). Наиболее высокая распространенность наблюдений с гиперметилицией *p16^{INK4A}* обнаруживалась в опухолях с высокой степенью атипичности (табл. 2.4.2). В трех новообразованиях высокой стадии и степени атипичности (одна с саркоматоидной метаплазией и два конвенционных почечноклеточных рака) отмечалась гиперметилиция в обоих генах. Наибольшее число случаев с гиперметилицией в промоторной зоне *p16^{INK4A}* гена выявлялось в опухолях с CIS и клеточной атипичностью в дистальных канальцах и собирательных трубочках медуллы перитуморальной почечной ткани, особенно при недифференцированных опухолях размерами более 7 см у больных из загрязненных радионуклидами регионов Украины (табл. 2.4.2).

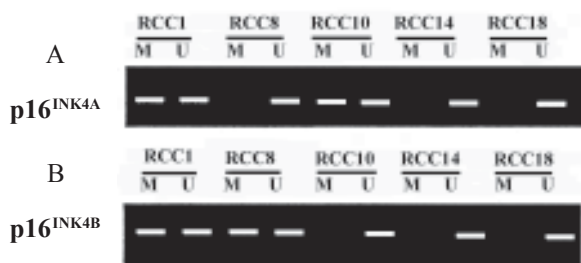


Рисунок 2.4.1. Метилиционный специфический ПЦР анализ промоторного региона (А) *p16^{INK4A}* и (В) *p15^{INK4B}* генов. Обнаружение видимого ПЦР-продукта в линиях U подтверждает наличие неметилированных генов; обнаружение продукта в линиях М подтверждает наличие метилированных генов. RCC1, RCC8, RCC10 и RCC14, относятся к конвенционному раку с загрязненных регионов (группы II-III). RCC18 – папиллярный почечный рак из группы I.

Что касается гена $p15^{INK4B}$, то никаких связей между его гиперметилацией и какими-то другими перечисленными выше параметрами выявить не удалось.

Таблица 2.4.2. Ассоциация между состоянием $p16^{INK4A}$ и результатами патологических и эпидемиологических исследований

Параметры	Гиперметилация $p16^{INK4A}$		P	Экспрессия $p16^{INK4A}$			
	Неметилированный	Метилированный		мРНК среднее значение $p16$ /актин (CO) ¹	P	среднее значение протеина % (CO) ¹	P
Радиационная нефропатия							
<50 %	10	3	НД ²	0,7 (0,3)	НД	11 (15)	НД
>50 %	5	4		0,5 (0,3)		3 (6)	
Цитологическая градация							
Высокодифференцированная		1	0,083	0,8 (0)	НД	0 (0)	НД
Умеренно дифференцированная	11	2		0,7 (0,3)		11 (14)	
Низкодифференцированная	4	4		0,6 (0,3)		3 (6)	
Размер опухоли							
<7 см	9		0,008	0,6 (0,4)	НД	9 (14)	НД
≥7 см	6	7		0,7 (0,2)		7 (11)	
Группы							
I	7		0,029	0,7 (0,3)	НД	14 (18)	0,106
II-III	8	7		0,6 (0,3)		5 (7)	

¹CO – стандартное отклонение;

²НД – недостоверные различия.

Изучение функционального состояния гена $p16^{INK4A}$ выявило низкий уровень или отсутствие экспрессии (как в РНК, так и в протеине гена) в опухолях с гиперметилацией в промоторной зоне, в сравнении с неметилированными опухолями. При сопоставлении экспрессии $p16^{INK4A}$ протеина с гистологическими и эпидемиологическими данными, мы отметили, что большинство недифференцированных опухолей с зонами *CIS* и клеточной атипией в перитуморальной почечной ткани

(с радиационной нефропатией) у больных с загрязненных радионуклидами регионов, экспрессировали пониженное количество (или отсутствие) p16^{INK4A} протеина в сравнении с опухолями из “чистых” зон Украины (табл. 2.4.2). Никаких ассоциаций между гиперметилацией гена p15^{INK4B}, экспрессией протеина, а также степенью атипичности опухолей в группах II и III выявить не удалось.

Иммуногистохимический анализ оксидативных маркеров выявил яркое их цитоплазматическое окрашивание. Экспрессия COX2 выявлялась преимущественно в низкодифференцированных опухолях из II и III группы размерами более 7 см. Что же касается экспрессии iNOS, то ее высокий уровень отмечался в наблюдениях с сильно выраженной радиационной нефропатией (более, чем в 50 % перитуморальной почечной ткани) (табл. 2.4.3).

Таблица 2.4.3. Ассоциация между экспрессией ферментов оксидативного стресса и результатами патологических и эпидемиологических исследований

¹НД – недостоверные различия.

Отмечалась тенденция в том, что COX2 – положительные опухоли обычно отличались более высоким содержанием p16^{INK4A} протеина в тех опухолях, где не определялась метиляция гена p16^{INK4A}. С другой стороны, экспрессия iNOS инверсионно зависела от экспрессии протеина p16^{INK4A}. Что же касается статуса гена p15^{INK4B}, то никаких ассоциаций его с оксидативным стрессом выявить не удалось.

Таким образом, результаты наших исследований впервые выявили в ПКР у лиц, проживающих в загрязненных радионуклидами регионах Украины, aberrантную гиперметиляцию в гене p16^{INK4A} и в меньшей степени в гене p15^{INK4B} со снижением иммуногистохимически выявляющейся экспрессией соответствующих протеинов, что сочеталось с резким повышением экспрессии COX2 и развитием радиационной нефропатии в перитуморальной ткани.

Метиляция, как известно, является важным эпигенетическим звеном при канцерогенезе у человека, тесно связанная с инактивацией генов, супрессирующих опухолевый рост [82, 85]. Результаты наших исследований продемонстрировали высокую распространенность случаев с гиперметиляцией гена p16^{INK4A} в ПКР у больных из II и III групп, в сравнении с I группой. Это подтверждает важную роль повышенного оксидативного стресса, индуцированного ИР, который приводит к повреждению p16^{INK4A}/Cyclin D1–Cdk4/pRb пути в этих опухолях.

Кроме того, мы обнаружили высокую частоту гиперметиляции гена p16^{INK4A}, и в меньшей мере p15^{INK4B} в опухолях ПКР высокой стадии и степени атипичности, а также в конвенционных раках с саркоматоидной метаплазией во II и особенно в III группе, что сопровождалось развитием хронической атипичной радиационной нефропатии в перитуморальной ткани [86]. Эти данные подтверждают важность p16^{INK4A}/pRb пути в качестве основной мишени при оксидативном стрессе, что в конечном счете приводит к активации прогрессии ПКР, формируя опухоли с более агрессивным фенотипом.

Интересно отметить, что некоторые свободные кислородные радикалы, как например, гидроксильные радикалы, являющиеся высоко реактивными и короткоживущими, могут превращаться в более стабильные (с более продолжительной жизнью) липидо-пероксидные радикалы (LOO), которые *in vivo* способны долго мигрировать и накапливаться в богатых жиром органах [71]. Такие химические

превращения типичны для почек и особенно для богатых жиром почечноклеточных опухолей, которые поэтому могут представлять собой особо привилегированную мишень для оксидативного стресса.

Мы использовали иммуногистохимический анализ для того, чтобы подтвердить угнетенную экспрессию $p16^{INK4A}$ протеина, обусловленную метиляцией ДНК в промоторной зоне гена $p16^{INK4A}$. С помощью иммуногистохимического анализа мы также подтвердили зависимость между экспрессией $p16^{INK4A}$ протеина и экспрессией COX2/iNOS в тех же опухолях (табл. 2.4.2 и 2.4.3). Существующая связь между цитоплазматической экспрессией COX2 и высоким процентом $p16^{INK4A}$ -позитивных клеток в группах II и III, особенно в наблюдениях с неметилованным $p16^{INK4A}$ геном, подтверждает прямое воздействие между индуцированным через воспалительный ответ оксидативный стресс, сопровождающийся повышением фермента COX2 и $p16^{INK4A}$ опухоль – супрессирующего гена. Этот ген инактивируется гиперметиляцией его промоторной части и может рассматриваться, как один из важнейших путей, ответственных за прогрессию почечноклеточного рака. Выявленное нами повышение экспрессии COX2 в ПКР в группах II и III тоже объясняется повышением опухолевой прогрессии. Многочисленные работы подтверждают важную роль COX2 в формировании и росте опухолей в экспериментальных моделях, а также в канцерогенезе толстой кишки, желудка и мочевого пузыря у человека [75, 87, 88].

Почечноклеточный рак человека не выявлял особой роли гиперметиляции генов $p16^{INK4A}$ и $p15^{INK4B}$ в его росте и развитии. Только в одной работе подтверждалась возможность индуцирования у крыс оксидативным стрессом развития ПКР, что сопровождалось инактивацией в $p16^{INK4A}$ и $p15^{INK4B}$ генов, супрессирующих опухолевый рост, при этом в работе указывалось, что это один из основных путей, ответственных за развитие почечноклеточного рака у крыс под действием оксидативного стресса [89], что весьма соответствует данным, полученным нами в настоящей работе.

В заключение можно предположить, что постоянный, пролонгированный оксидативный стресс, индуцированный долговременным действием малых доз ИР на почечноклеточный рак у лиц, проживающих в загрязненных радионуклидами регионах Украины, может играть важную и ведущую роль в развитии опухолевой прогрессии через

разрушение внутриклеточных трансдукционных сигнальных систем, сопровождающейся инактивацией преимущественно $p16^{INK4A}$ и менее $p15^{INK4B}$ генов в сочетании со значительным повышением COX2 в тех же самых опухолях. Дальнейшие исследования необходимы для выяснения роли оксидативного стресса в развитии ПКР человека, а также для развития в соответствии с этим новых терапевтических направлений.

ГЛАВА 2.5. INK4a/ARF локус: роль факторов контролирующих клеточный цикл для развития почечноклеточных эпителиальных опухолей (ПКЭО)

За последнюю декаду молекулярные механизмы, контролирующие клеточную пролиферацию, пережили революцию, благодаря открытию и описанию “часового аппарата” клеточного цикла. Этот молекулярный механизм, работающий в ядре клетки, состоит из трех компонентов: циклинзависимых киназ (CDKs), циклинов и ингибиторов циклинзависимых киназ (CKIs). Известны два семейства CKI: KIP и INK4. В процессе клеточного цикла на его разных фазах образуются различные специфические циклин-CDK комплексы, каждый из которых предназначен для фосфорилирования определенного набора протеинов-мишеней, что в конечном итоге “продвигает” клетку через фазы клеточного цикла [90].

Cyclin D1 в сочетании со своими партнерами CDK4 и CDK6 “атакуют” продукт гена ретинобластомы (pRb) с целью его фосфорилирования, необходимого для перехода клетки из G1 в S-фазу [91]. В начале G1 фазы pRb связывается и инактивирует некоторые E2F транскрипционные факторы, которые играют важную роль в подготовке ядра к репликации ДНК [92]. Разрушение *Rb* и *p53*, супрессирующих опухолевый рост генов, – основной путь или пассаж для большинства раковых клеток человека [93, 94]. При канцерогенезе потеря функции *Rb* гена проявляется мутациями, секвестрацией Rb протеина онкопротеинами, промоторной гиперметилиацией, либо потерей регуляции генов, контролирующих Rb-фосфорилирование [90, 93]. Эти последние повреждения включают амплификацию *cyclin D1* гена, мутации, активированные *CDK4*, а также амплификацию и инактивацию генов – ингибиторов *CDK4* – семейства *INK4*, состоящего из генов *p16^{INK4A}*, *p15^{INK4B}*, *p18^{INK4C}* и *p19^{INK4D}* [95].

Недавно стало известно, что ген *p16^{INK4A}* обладает способностью дополнительно кодировать второй продукт, названный *p19^{ARF}* у мышей [96] или *p14^{ARF}* – у человека, имеющий уникальный первый экзон 1-бета, расположенный в 20 кв и центрально по отношению к первому экзону гена *p16^{INK4A}* (известного, как экзон 1-альфа). Под контролем своего промотора экзон 1-бета соскальзывает к экзону 2 *INK4A* в альтернативной считывающей рамке (ARF), продуцируя другой, чем

p16^{INK4A}, протеин [79]. p14^{ARF} является антагонистом для mdm2 – зависимой деградации p53 и индуцирует арест G1 и G2 фаз через механизм, независимый от p16^{INK4A} [97].

Радиационный канцерогенез может быть модулирован разными факторами. Прежде всего было высказано предположение, что потеря нормального контроля над переходом G1 в S-фазу приводит к генетической нестабильности, развивающейся в облученных клетках, что ведет к потере нормальной функции супрессирующего опухолевый рост гена *p53* [98].

Другой путь сигнальной трансдукции, который может быть стимулирован ИР, известен, как MAPK (митоген активирующая протеин киназа) каскад.

Суперсемейство MAPK является потенциальной мишенью для оксидативного стресса и играет важную роль в передаче информации (импульсов) от клеточной мембраны к ядру в ответ на действие каких-либо классических факторов роста или клеточный стресс [99]. У млекопитающих известны четыре группы MAPKs. Группа p38MAPKs (известная также как CSBP) является частью раннего ответа на стресс, который в первую очередь активируется в клетке в ответ на тепловой или осмотический шок, ультрафиолетовое облучение, ионизирующую радиацию (ИР) или воспалительные цитокины, вызывая подавление клеточной пролиферации или клеточную смерть [100, 101].

Регуляция p38MAPK осуществляется стрессзависимыми сигналами через различные киназы, которые фосфорилируют различные молекулярные субстанции [102, 103]. Было показано также, что ¹³⁷Cs гамма-лучи в низких дозах вызывают оксидативный стресс и активируют транскрипционный фактор, индуцирующий различные гены, контролируемые клеточную пролиферацию клеток крови человека [104, 105].

Авария на ЧАЭС впервые привела к проблеме хронического долговременного и постоянного действия малых доз ИР на человека. В предыдущих главах мы показали, что за истекшие 16-17 лет после аварии существенно возросли заболеваемость, агрессивность и пролиферативная активность, проявляющаяся высокой экспрессией PCNA и K-ras, почечноклеточного рака у больных на Украине. Это сопровождалось развитием “радиационной склерозирующей пролиферативной атипической нефропатии” в перитуморальной почечной ткани, демонстрирующей прямую корреляцию с продолжительностью

радиационного воздействия [86]. Было доказано также влияние хронического, регулярного и постоянного действия малых доз ИР на почечно-клеточный канцерогенез для популяции населения, проживающей в загрязненных ^{137}Cs (который составляет 80-90 % среди прочих радионуклидов) регионах Украины [87].

Однако истинные механизмы действия малых доз ^{137}Cs , а также возможные механизмы активации путей сигнальной трансдукции в почке человека (которые, как известно, играют ведущую роль в концентрации и элиминации ^{137}Cs с мочой) до настоящего времени не известны.

В связи с этим мы попытались изучить характер и частоту молекулярных повреждений, супрессирующих опухолевый рост генов, локализующихся на хромосоме 9p21 (*INK4A/ARF locus* и *p15^{INK4B}*) в 26 первичных почечноклеточных эпителиальных опухолях и перитуморальной почечной ткани у больных с разной экспозицией ИР после аварии на ЧАЭС в Украине. Маркер MAPK сигнальной трансдукции протеин p38MAPK также анализировался. Кроме того, мы изучили повреждения супрессирующего опухолевый рост гена *p53* и генетическую амплификацию *cyclin D1* и *mdm2* в сочетании с иммуногистохимическим выявлением экспрессии протеинов указанными генами в тех же препаратах.

Всего было изучено 112 фиксированных в формалине и залитых в парафин тканевых блока (примерно по 4 блока на каждое наблюдение) и замороженный материал от 26 больных с почечноклеточными эпителиальными опухолями, включая перитуморальную почечную ткань, оперированных в Институте урологии АМН Украины (г. Киев). Первая контрольная группа больных, проживающих в “чистых” (без загрязнения радионуклидами) регионах Украины, II группа больных из менее загрязненных (г. Киев) и III группа из более загрязненных регионов Украины. У всех больных проводилось радиометрическое измерение ^{137}Cs в моче, собранной за 24 часа в предоперационный период с помощью Стандартного гамма-радиометра RUB-01. Данные патологического и эпидемиологического исследований суммированы в таблице 2.5.1. Препараты для нашего исследования были получены от 16 мужчин и 10 женщин со средним возрастом 54 года, проживающих в Украине в регионах с разной степенью загрязненности ^{137}Cs . У больных II и III групп отмечался значительный подъем уровня

^{137}Cs в моче, в сравнении с I группой. Оказалось, что у больных с наиболее высоким уровнем ^{137}Cs в моче опухоли характеризовались наибольшими размерами ($p = 0,02$) и высокой стадией.

Таблица 2.5.1. Результаты патологических и эпидемиологических исследований

	Группа I	Группа II	Группа III
Количество пациентов	7	10	9
Средний возраст	54 (40-73)	55 (46-65)	52 (35-70)
Уровень радиационного загрязнения почвы (Ки/км ²)	НЗ ¹	0,5-5	5-30
Удельная активность ^{137}Cs в суточной моче	0,37 (0,32-0,41)	0,91 (0,54-1,27)	2,4 (0,64-3,64)
Средний размер опухоли	6,78 (3-14)	7,85 (5-12)	9,66 (4-18)
Стадия опухоли			
I	4	3	1
II	2	1	4
III	–	3	4
Гистологический тип:			
– конвенционный рак;	5	5	7
– папиллярный;	–	1	–
– хромофобный;	–	1	–
– собирательных протоков (Bellini);	–	–	1
– нейроэндокринный;	–	–	1
– онкоцитомы	1	3	–
Градация:			
– высокодифференцированный;	4	1	2
– умеренно дифференцированный;	2	5	3
– низкодифференцированный	–	1	4

¹НЗ – незагрязненные радионуклидами территории.

Преобладал конвенционный почечноклеточный рак, выявленный у 17 (65 %) из 26 больных с примерно одинаковым распределением по группам. Сравнительный анализ выявил преобладание ПКР высокой степени злокачественности у больных, проживающих в загрязненных радионуклидами регионах Украины. В двух низкодифференцированных ПКР выявлялись саркоматоидные изменения. Кроме того, наиболее четкие корреляции наблюдались между низкодифференцированными ПКР и наиболее высоким уровнем ^{137}Cs в моче, по сравнению с умеренно и высокодифференцированными опухолями. Воспалительная

реакция отмечалась в 12 случаях с преимущественно слабой (6 наблюдений), умеренной (5 наблюдений) и, только в одной опухоли, сильной воспалительной инфильтрацией. В большинстве наблюдений из II и III групп определялись очаги клеточной атипии и реже – рака *in situ* в проксимальных и дистальных канальцах.

Онкоцитомы почки диагностированы в 4 (15 %) из 26 наблюдений у одного больного из I группы и 3 больных из II группы.

Данные иммуногистохимического анализа и молекулярной биологии суммированы в таблице 2.5.2.

Таблица 2.5.2. Результаты молекулярных и иммуногистохимических исследований ПКТ

	Группа I	Группа II	Группа III
Количество пациентов	6	7	1
Гиперметилиция p14 ^{ARF}	–	3	1
Средняя экспрессия p14 ^{ARF} (CO) ¹	0,83 (1,1)	24,75 (35,82)	11,33 (12,40)
p53 >10 % окрашенных	1	1	1
Средняя экспрессия MDM2 (CO)	19,16 (18,19)	38,14 (15,23)	33,11 (34,48)
Выраженная интенсивность экспрессии p38 ^{МАРК}	–	4	5
p38 ^{МАРК} >10 % окрашенных	4	7	7
Средняя экспрессия Ki-67 (CO)	6,16 (10,81)	13 (8,28)	13 (18,26)
Гиперметилиция p16 ^{INK4A}	1	1	1
Средняя экспрессия p16 ^{INK4A} (CO)	10,83 (12,56)	6 (6,42)	19,11 (32,30)
Средняя экспрессия Cyclin D1(CO)	2,33 (4,80)	3 (4,39)	10,66 (13,53)

¹CO – стандартное отклонение.

Молекулярный анализ не выявил гомозиготные делеции генов *p16^{INK4A}*, *p15^{INK4B}*, *p14^{ARF}* ни в одном наблюдении, равно как не выявил генетических амплификаций для генов *mdm2*, *cyclin D1* и *CDK4*. Никаких связей не было обнаружено между гиперметилицией гена *p15^{INK4B}* и различными патогистологическими и эпидемиологическими параметрами. В 4 (18 %) наблюдениях ПКТ высокой стадии и степени злокачественности из II и III групп выявлена гиперметилиция 5' CpG сайтов в промоторном регионе *p14^{ARF}* гена.

Ядерная экспрессия p53 протеина обнаружена в 3 (13 %) наблюдениях конвенционного рака с >10 и <50 % окрашенных ядер и в 4 (18 %) из 26 наблюдений (один папиллярный, один рак Bellini и 2 конвенционных ПКР) с менее 10 % окрашенных ядер преимущественно из II и III групп. Почечноклеточный рак у больных из загрязненных радионуклидами регионов экспрессировал в большом количестве p14^{ARF} протеин, в сравнении с опухолями из “чистых” регионов. Прямая корреляция выявлялась между p14^{ARF} протеином и экспрессией mdm2 в ПКР из I-III группы с наиболее высокой экспрессией p14^{ARF} и mdm2 в загрязненных регионах, что сочеталось с негативным окрашиванием на p53 протеин, подтверждая преобладание его “дикого типа” (WT p53).

Пролиферативная активность (Ki-67 окрашенные ядра) была наиболее высокой во II и III группах опухолей. При этом наиболее высокий уровень окрашивания был в ПКР высокой степени злокачественности.

Равномерное, гомогенное или гранулярное p38МАРК цитоплазматическое окрашивание обнаруживалось в 100 (78 %) наблюдениях II и III групп, соответственно. Кроме того, отмечалось соотношение низкой и негативной экспрессии p16^{INKA4} протеина и высокой экспрессии в ядрах cyclin D1 в одних и тех же клетках и опухолях ПКР II и III групп, сопровождающееся гиперметилизацией 5' CpG сайтов промоторного региона p16^{INKA4} гена в 10 % этих новообразований. Интересно отметить, что гиперметилизация p16^{INKA4} и p14^{ARF} никогда не обнаруживалась в одних и тех же препаратах. Никакой зависимости не было обнаружено между экспрессией протеинов mdm2, cyclin D1, а также p16^{INKA4} и p14^{ARF} и гистологическими параметрами ПКР, его стадийностью и степенью злокачественности. Участки экспрессии p16^{INKA4} и p14^{ARF} протеинов часто были неравномерными, чередующимися с зонами негативного окрашивания.

Гиперметилизация промоторных регионов p16^{INKA4} и p14^{ARF} генов неожиданно была выявлена в перитуморальной почечной ткани, преимущественно в корковом веществе в зонах клеточной атипии.

В онкоцитомах почки молекулярные изменения в генах p16^{INKA4}, p15^{INK4B}, p14^{ARF} не обнаруживались. Экспрессия p53 протеина во всех онкоцитомах была негативной. Онкоцитомы во II группе позитивно окрашивались на mdm2 в 11, 15 и 30 % опухолевых клеток. Кроме

того, в 2 наблюдениях II группы выявлялась экспрессия *suclin D1* в 1 и 26 % окрашенных клеток, соответственно. К1-67 иммуноокрашивание было положительным в трех онкоцитомах с уровнем окрашивания 0,3, 0,2 и 2 %, соответственно. Все онкоцитомы были p38МАРК положительны с гранулярным цитоплазматическим окрашиванием, однако интенсивность его была высокой лишь в одной опухоли. Интересно также отметить, что уровни содержания ^{137}Cs в моче выявляли прямую корреляцию с экспрессией p14^{ARF} ($p=0,005$) и *mdm2* ($p=0,044$) протеинов.

Проведенное нами исследование впервые продемонстрировало специфические повреждения в локусе *INK4a/ARF* хромосомы 9q21 в первичных эпителиальных почечноклеточных опухолях человека и в окружающей опухоль почечной ткани у больных, подвергнутых хроническому действию малых доз ИР, так как они проживали в загрязненных радионуклидами регионах Украины. Проведенное радиометрическое исследование выявило достоверное повышение уровня ^{137}Cs в суточной моче у этих же больных, что подтверждало влияние малых доз ионизирующего излучения на почечную ткань. В диапазоне 2-12 Гр, как известно, отсутствует зависимость доза-ответ, что указывает на возможность индуцирования генетически нестабильного фенотипа очень малыми дозами радиации [106].

В работах последнего десятилетия особое внимание вызвала проблема клеточных и молекулярных механизмов действия малых доз ИР (в пределах 0,5-1 Гр) у млекопитающих [16, 106]. Достаточно большое количество исследований на различных биологических объектах показали, что облучение цитоплазмы, которое в первую очередь имеет место при хроническом действии малых доз ИР достоверно увеличивает число мутаций в культурах клеток и тканях млекопитающих [107, 108]. Кроме того, “bystander” или нецелевой эффект очень малых доз ИР недавно был описан, как важное генетическое следствие ИР, возникающее в клетках, которые сами не были облучены [106]. Таким образом, действительной мишенью для радиационного эффекта клеточной популяции может оказаться значительно большее число клеток, чем число непосредственно облученных клеток. Эти данные поддерживают нашу гипотезу о том, что долговременное (более 17 лет) постоянное действие малых доз ионизирующего излучения приводит к хроническому повреждению ДНК с нарушением

молекулярных механизмов, контролирующих клеточную пролиферацию – “часовой механизм” клеточного цикла.

Наше исследование доказало, что в почечноклеточном раке у больных, проживающих в загрязненных радионуклидами регионах Украины, выявлена aberrантная гиперметилиция генов *p16^{INK4A}* и *p14^{ARF}* в сочетании с повышенными уровнями протеинов mdm2 и sucln D1 (рис. 2.5.1). Кроме того, характерным было то, что *p14^{ARF}* промоторная гиперметилиция выявлялась независимо от статуса метилиции гена *p16^{INK4A}*, однако всегда при наличии стабильного статуса гена *p53*, сопровождающегося повышением уровней протеинов mdm2 и *p14^{ARF}* в тех же самых опухолях. Недавно появились работы, указывающие на то, что *p14^{ARF}*, действуя через mdm2, подавляет деградацию гена *p53* и что экзон 1-бета “отвечает” за обеспечиваемую *p14^{ARF}* стабилизацию функции гена *p53* [94].



Рисунок 2.5.1. Репрезентативный анализ *p16^{INK4A}* и *p14^{ARF}* гиперметилиции: М – метилированный статус; U – неметилированный статус.

Пожалуй, впервые нам удалось выявить в почечноклеточном раке специфические повреждения в виде *p14^{ARF}* промоторной гиперметилиции в сочетании с положительным окрашиванием *p14^{ARF}* протеина. При этом во всех наблюдениях указанные изменения никогда не относились к соседствующему гену *p16^{INK4A}*, а также инактивация *p14^{ARF}* никогда не сочеталась с инактивацией гена *p53*.

Наиболее интригующим открытием была очень высокая частота гиперметилиции гена *p14^{ARF}* в перитуморальном корковом веществе почки. Следует добавить, что выявленные в нем изменения в виде промоторной гиперметилиции *p14^{ARF}* оказались не только часто встречающимися, но и ранними проявлениями при почечноклеточном канцерогенезе, совершенно не связанными с мутациями гена *p53*. Подобные

сочетания $p14^{ARF}$ промоторной гиперметилиации с WT p53 были недавно описаны при первичном канцерогенезе толстой кишки [97].

Промоторная гиперметилиация гена $p16^{INKA4}$ в трех наблюдениях сочеталась со снижением или потерей p16^{INKA4} протеина; и в этих же опухолях отмечалось повышение экспрессии cyclin D1. Как известно, в ответ на малые дозы ультрафиолетового облучения происходит накопление p16^{INKA4} протеина в клеточных линиях, что сочеталось с задержкой G1-фазы клеточного цикла. Потеря же функции $p16^{INKA4}$ приводила к потере вызванного ультрафиолетовым облучением G1 ареста клеточного цикла [109]. С другой стороны, высокий уровень cyclin D1, как известно, часто наблюдается в различных опухолях человека: молочной железы, мочевого пузыря, плоскоклеточном раке шеи и головы [52, 110].

В ПКР $p16^{INKA4}$ промоторная гиперметилиация никогда не комбинировалась с $p14^{ARF}$ промоторной гиперметилиацией. Наиболее часто встречающейся была ситуация отсутствия метилиации в обоих промоторах, а затем – следующие два возможных сценария (только $p16^{INKA4}$ метилиация или только $p14^{ARF}$ метилиация, в отдельности) также достаточно часто наблюдались. Эти данные подтвердили существование многочисленных взаимосвязей между p16^{INKA4}/Rb и p14^{ARF}/p53 пассажами в почечноклеточном раке. Кроме того, наши результаты подтверждают последние опубликованные работы, указывающие на потенциальную возможность изменений статуса гена $p16^{INKA4}$ – наиболее важного опухолюсупрессирующего гена в этом локусе, в то время как при этом происходило подавление или потеря гена $p14^{ARF}$, который существует независимо от $p16^{INKA4}$ в этом же локусе [79]. Функциональная инактивация негативных регуляторов клеточного цикла ведет к потере регуляторного контроля над клеточным циклом и, таким образом, – к клеточной трансформации [93].

Обычно $p16^{INKA4}$ и $p14^{ARF}$ опухолюсупрессирующие гены в нормальных условиях никогда не поддерживают пролиферативных процессов, они как бы “ожидают”, чтобы их активировали в ответ на определенные сигналы. Эти сигналы идентифицируют онкогенные, либо вызываемые другими стрессами гены. Оксидативный стресс, индуцированный ИР, обычно включает продукцию реактивных оксидативных радикалов в активированных митохондриях, вызывая в свою

очередь активацию MAP киназ; при этом p38 MAPK каскад известен, как важнейший сигнальный компонент, реагирующий на выработку реактивных оксидативных радикалов. Долговременное действие малых доз ИР на людей, проживающих в загрязненных радионуклидами регионах Украины, хронически индуцирует постоянно действующую активацию транскрипционных факторов, и в частности p38 MAPK каскада. Мы выявили достоверную связь между высокой иммунореактивностью протеинов p38 MAPK и ПКР у больных II и III групп. Постоянно повышенные уровни p38 MAPK обычно ведут к активации транскрипционного фактора – ядерного фактора карра В, ответственного за трансактивацию в злокачественный фенотип и далее – за опухолевую прогрессию [111, 112].

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что долговременное действие малых доз ИР стимулирует, по-видимому, различные пути сигнальной трансдукции (оба, p16^{INKA4}/Rb и p14^{ARF}/p53 пассажа) одновременно. Последние исследования подтвердили, что недостаточность INKA4/ARF локуса имеет сильное влияние на канцерогенез. При этом оказалось, что, например, в глиомах и меланомах различные клеточные типы обладают различной чувствительностью к генетическим изменениям и INKA4/ARF [78].

В заключение следует отметить, что выявленная тенденция к инаktivации p16^{INKA4} и p14^{ARF} генов путем промоторной гиперметилизации играет важную роль в патогенезе ПКР у больных, проживающих в загрязненных радионуклидами регионах Украины. Кроме того, часто встречающаяся p14^{ARF} промоторная гиперметилизация в перитуморальной почечной ткани позволяет понять роль регуляторных нарушений в фазе G1-S клеточного цикла в развитии предраковых изменений и почечноклеточном канцерогенезе, а также подумать о разработке и применении новых соответствующих схем лечения.

INKA4/ARF-локус играет, таким образом, ключевую роль в механизмах, отвечающих на постоянное действие малых доз ИР. Оказалось также, что активация p38 MAPK каскада также относится к механизмам, включающимся в ответ на малые дозы ИР в нормальной почке человека. Хроническая, но регулярная и постоянно действующая активация INKA4/ARF-локуса, который является мишенью для оксидативного стресса, вызывающего активацию p38 MAPK каскада,

ведет к повреждению и потере функции контрольных пунктов клеточного цикла с последующим изменением контроля за митотическим циклом, приводящим затем к клеточной трансформации.

Для дальнейшего изучения молекулярных основ патологии почечноклеточных эпителиальных опухолей, развивающихся в условиях хронического действия малых доз ИР, необходимо проведение новых исследований, которые бы позволили разработать более совершенные диагностические и прогностические критерии для таких новообразований, а также изучить новые пути для более эффективного их лечения.

Литература

1. McLaughlin J.K., Lipworth L. Epidemiologic aspects of renal cell cancer // *Semin. Oncol.* – 2000. – Vol.2. – P.115-123.
2. Black R., Bray F., Ferlay J., Parkin D. Cancer statistics // *Eur. J. Cancer.* – 1997. – Vol. 33. – P.1075-1107.
3. Shingleton W.B., Blalock J., Clark J., Bigler S.A. Renal cell carcinoma in native kidneys of patients with end stage renal disease // *J. Mississippi St. Medic. Assoc.* – 1998. – Vol. 39. – P. 86-89.
4. Mandel J.S., McLaughlin J.K., Schlehofer B. et al. International renal-cell cancer study. IV. Occupation // *Int. J. Cancer.* – 1995. – Vol. 61. – P. 601-605.
5. Байда Л.К., Романенко А.Е., Михайлов А.В. Оценка влияния радиационных и нерадиационных факторов окружающей среды на заболеваемость населения, пострадавшего от аварии на ЧАЭС // *Эпидемиология медицинских последствий аварии на Чернобыльской АЭС.* – К.: Медэкол, 1999. – С.153-167.
6. Возіанов О.Ф., Сайдакова Н.О., Павлова Л.П., Непомнящий В.М. Епідеміологічний аналіз захворюваності на рак нирки у радіаційно забруднених регіонах України // *Урологія.* – 2000. – №4. – С.3-10.
7. Романенко А.Ю. Біологічні ефекти низьких доз іонізуючого опромінення // *Журн. АМН України.* – 1999. – №2. – С.199-209.
8. Сердюк А.М. Навколишнє середовище і здоров'я населення України // *Довкілля та здоров'я.* – 1998. – № 4. – С.2-6.
9. Thompson D.E., Mabuchi K., Ron E. et al. Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part II: Solid tumors, 1958-1987 // *Radiation Research.* – 1994. – Vol.137. – P.7-67.
10. Серкиз Я.И., Индык В.М., Липская А.И., Родионова Н.К. Бластомогенез, индуцированный радиацией разного качества // *Тезисы II съезда онкологов стран СНГ, Киев, 23-26 мая 2000.* – С.107.
11. Kozma L., Kiss I., Nagy A. et al. Investigation of *c-myc* and *K-ras* amplification in renal clear cell adenocarcinoma // *Cancer Lett.* – 1998. – Vol.111. – P.127-131.
12. Morell-Quadreny L., Clar-Blanch F., Fenollosa-Enterna B. et al. Proliferating cell nuclear antigen as a prognostic factor in renal cell carcinoma // *Anticancer Res.* – 1998. – Vol.18. – P.677-682.
13. Seliger B., Rongcun Y., Atkins D. et al. HER-2/neu is expressed in human renal cell carcinoma at heterogeneous levels independently of tumor grading and staging and can be recognized by HLA-A2.1-restricted cytotoxic T lymphocytes // *Int. J. Cancer.* – 2000. – V.87. – P.349-359.
14. Васильев К.Г., Голяченко А.М. Методы эпидемиологического изучения неинфекционных болезней. – К.: Здоров'я, 1983. – 123 с.

15. Bostwick D.C., Murphy G.P. Diagnosis and prognosis of renal cell carcinoma: highlights from an international consensus workgroup // *Sem Urol. Oncol.* – 1998. – Vol.16. – P.46-52.
16. Trosko J.E. Role of low-level ionizing radiation in multi-step carcinogenic process // *Health. Phys.* – 1996. – Vol.70. – P.812-822.
17. Fahraeus R., Fisher P., Krausz E. and Lane D. New approaches to cancer therapies // *J. Pathol.* – 1999. – Vol.187. – P.138-146.
18. Gasey P, Seabra M. Protein prenyltransferases // *J. Biol. Chem.* – 1996. – Vol.271. – P.5289-5292.
19. Kumar R., Mandal M., Vadlamudi R. New insights into anti-HER-2 receptor monoclonal antibody research // *Semin. Oncol.* – 2000. – Vol. 27. – P.84-100.
20. Raes F., De Cort M., Graziani G. Multi-factoral nature of radioactivity deposition on soil after the Chernobyl accident // *Healt Phys.* – 1991. – V. 61. – P. 271-282.
21. Onishi T., Ohishi Y., Iizuki H., Hosobe T., Nakajo H., Aizawa S., Suzuki M. Clinicopathological study on patients with chromophobe cell renal carcinoma // *Nippon Hinyokika Gakkakai Zasshi.* – 1996. – V. 87. – P. 1167-1174.
22. Ono Y., Ito T., Tsujino S., Aizawa S., Suzuki M. A study of papillary renal cell carcinoma: clinicopathological, immunohistochemical features and its typing // *Nippon Hinyokika Gakkakai Zasshi.* – 1997. – V. 88. – P. 587-595.
23. Harper M., Glynne J.L., Goddard L., Wilson W., Matenhelia S., Conn I., Peeling B., Griffiths K. Relationship of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in prostatic carcinoma to various clinical parameters // *Prostate.* – 1992. – V. 20. – P. 243-249.
24. Kelman Z. PCNA: structure, functions and interactions // *Oncogene* – 1997. – V. 14. – P. 629-640.
25. Cronin K., Williams N.N., Kerin M.J., Creagh T.A., Dervan P. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) correlates with tumor grade in renal cell carcinoma // *J. Urol.* – 1992. – V. 147. – P. 227-234.
26. Larsson P. Cell proliferation in renal cell carcinoma: a clinical study with special reference to prognosis // *Scand. J. Urol. Nephrol. Suppl.* – 1994. – V. 165. – P. 132-137.
27. Diakoumis E., Sourvinos G., Kiaris H., Delakas D., Cranidis A., Spandidos D.A. Genetic instability in renal cell carcinoma // *Eur. Urol.* – 1998. – V. 33. – P. 227-232.
28. Shinohara N., Ogiso Y., Tanaka M., Harabayashi T., Koyanagi T. The significance of Ras guanine nucleotide exchange factor, son of sevenless protein in renal cell carcinoma cell lines // *J Urol.* – 1997. – V. 158. – P. 908-911.
29. Nanus D.M., Mentle I.R., Motzer R.J., Bander N.H., Albino A.P. Infrequent ras oncogene point mutations in renal cell carcinoma // *J. Urol.* – 1990. – V. 143. – P. 175-178.
30. Borek C. Oncogenes and cellular controls in radiogenic transformation of rodent and human cells // *carcinogenesis: comprehensive survey – the role of*

- chemicals and radiation in the etiology of cancer. – New York: Raven, 1985. – P. 303-316.
31. Kaminsky S., Mulcahy R.T., Zain S. Oncogene expression in a radiation induced rat thyroid carcinoma // *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* – 1985. – V. 26. – P. 256-262.
 32. Sarvey J., Garte S.J. Activation of myc and ras oncogenes in radiation-induced rat skin tumors // *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* – 1986. – V. 27. – P. 21-29.
 33. Bernhard E.J., McKenna W.G., Hamilton A.D., Sebti S.S., Qiau Y., Wu J.M., Husschel R.M. Inhibiting ras prenylation increases the radiosensitivity of human tumors cell lines with activating mutations of ras oncogenes // *Cancer Res.* – 1998. – V. 58. – P. 1754-1761.
 34. Guerrero I., Villasante L., Diamond L., Berman J.W., Newcomb E.W., Steinberg J.J., Lake R., Pellier A. Oncogene activation and surface markers in mouse lymphomas induced by radiation and nitrosomethylurea // *Leukemia Res.* – 1986. – V. 10. – P. 851-858.
 35. Mothersill C., Harney J., Lyng F., Cottell D., Persons K., Murphy D.M., Seymour C.B. Primary explants of human uroepithelium show an unusual response to low-dose irradiation with cobalt-60 gamma rays // *Radiation Res.* – 1995. – V. 142. – P. 181-187.
 36. Mulcahy R.T. Radiation carcinogenesis // *The Pathology of Neoplasia.* - Sirica Plenum Press. NY, London, 1989. – P. 111-125.
 37. Upton A.C. Biological aspects of radiation carcinogenesis // *Progress in Cancer Research and Therapy.* – Raven, New York, 1984. – P. 9-19.
 38. Cohen E.P., Fish B.L., Moulder J.E. Angiotensin II infusion exacerbates radiation nephropathy // *J. Lab. Clin. Med.* – 1999. – V. 134, №3. – P. 283-281.
 39. Forman J.D. The role of radiation therapy in the management of carcinoma of the kidney // *Seminars in Urology.* – 1989. – V. 7, №3. – P. 195-198.
 40. Zallinger C., Tempel K. Chronic damage in domestic animals after ionizing radiation // *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* – 1998. – V. 111. – P. 457-463.
 41. Vogelzang N.J., Yang X., Goldman S., Vijayakumar S., Steinberg G. Radiation induced renal cell cancer: a report of 4 cases and review of the literature // *J. Urol.* – 1998. – V. 160. – P. 1987-1990.
 42. Richmond C.R. Accelerating the turnover of internally deposited radiocesium // *Diagnosis and Treatment of Deposited Radionuclides.* – Excerpta Medical Foundation, Battelle-Northwest Richland WA, 1968. P. 315-325.
 43. Trosko J.E. Radiation-induced carcinogenesis: Paradigm considerations // *Biological effects of low level exposures: Dose-response relationships.* – Boca Raton, FL: Lewis Publishers, 1994. – P. 205-241.
 44. Inano H., Suzuki K., Ishii-Ohba H., Yamanouchi H., Takahashi M., Wakabayashi K. Promotive effects of diethylstilbestrol, its metabolite (2,2-dienestrol) and a stereoisomer of the metabolite (E, E-dienestrol) in tumorigenesis of rat mammary

- glands pregnancy-dependently initiated with radiation // *Carcinogenesis*. 1993. – V. 14. – P. 2157-2163.
45. Suzuki K., Ishii-Ohba H., Yamanouchi H., Takahashi M., Wakabayashi K., Inano H. Susceptibility of lactating rat mammary glands to gamma ray-irradiation-induced tumorigenesis // *Int. J. Cancer*. – 1994. – V. 56. – P. 413-417.
 46. Robbins B.A., de la Vega D., Ogata K., Tan E.M., Nakamura R.M. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in solid human malignances // *Arch. Pathol. Lab. Med.* – 1987. – V. 111. – P. 841-845.
 47. Cares C., Hancock J.F., Marshall C.J., Hall A. The cytoplasmic protein GAP is implicated as the target for regulation by the ras gene product // *Nature*. – 1988. – V. 332. – P. 548-551.
 48. Lai R., Dabbagh L., Mourad W.A. Mutant p53 expression in kidney tubules adjacent to renal cell carcinoma: evidence of a precursor lesion // *Mod. Pathol.* – 1996. – V. 9. – P. 690-695.
 49. Mourad W.A., Nestok B.R., Saleh G.Y., Solez K., Power R.F., Jewell L.D. Dysplastic tubular epithelium in «normal» kidney associated with renal cell carcinoma // *Am. J. Surg. Pathol.* – 1994. – V. 18. – P. 1117-1124.
 50. Yorukoglu K., Aktas S., Mungan M.U., Kirkali Z. Tubular dysplasia and carcinoma in situ: precursors of renal cell carcinoma // *Urol.* – 1999. – V. 53. – P. 684-689.
 51. Fleming S., Matthews T.J. Renal tubular antigens in regenerative epithelium and renal carcinoma // *Br. J. Urol.* – 1987. – V. 60. – P. 103-109.
 52. Romanenko A., Lee C.C.R., Yamamoto S., Hori T., Wanibuchi H., Zamarin W., Vinnichenko W., Voizianov A., Fukushima S. Urinary bladder lesions after the Chernobyl accident: immunohistochemical assessment of p53, proliferating cell nuclear antigen, cyclin D1 and p21^{WAF1/Cip1} // *Jpn. J. Cancer Res.* – 1999. – V. 90. – P. 144-153.
 53. Lumniczky K., Antal S., Unger E., Wanderlich L., Hidvegi E.J., Safrani G. Carcinogenic alterations in murine liver, lung and uterine tumors induced by in utero exposure to ionizing radiation // *Mol. Carcinogenesis*. – 1998. – V. 21. – P. 100-110.
 54. Nishimura M., Wakana S., Kakinuma S., Mita K., Ishii H., Kobayashi S., Ogiu T., Sado T., Shimada Y. Low frequency of Ras gene mutation in spontaneous and gamma-ray-induced thymic lymphomas of scid mice // *Radiat Res.* – 1999. – V. 151. – P. 142-149.
 55. Bolontrade M.F., Stern M.C., Binder R.L., Zenklusen J.C., Gimenez-Conti I.B., Conti C.J. Angiogenesis is an early event in the development of chemically induced skin tumors // *Carcinogenesis*. – 1998. – V. 19. – P. 2107-2113.
 56. Shin E.Y., Park M.K., Jeong G.B., Kim E.G., Kim S.Y. H-ras is a negative regulator of alpha 3 beta 1 integrin expression in ECV 304 endothelial cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999. – V. 257. – P. 95-99.

57. Delahunt B., Bethwaite P.B., Thornton A. Prognostic significance of microscopic vascularity for clear cell renal cell carcinoma // *Br. J. Urol.* – 1997. – V. 80. – P. 401-404.
58. Yoshino S., Kato A., Okada K. Evaluation of the prognostic significance of microvessel count and tumor size in renal cell carcinoma // *Int. J. Urol.* – 1998. – V. 5. – P. 119-123.
59. Trott K.R. Biological mechanisms of radiation carcinogenesis // *Eur. J. Cancer Prevent.* – 1996. – V. 5. – P. 377-378.
60. Tubiana M. The report of the French Academy of Science: «Problems associated with the effects of low doses of ionizing radiation» // *J. Radiol. Prot.* – 1998. – V. 18. – P. 243-248.
61. Umezawa A., Harigaya K., Abe H., Watanabe Y. Gap-junctional communication of bone marrow stromal cells is resistant to irradiation in vitro // *Exp. Hematol.* – 1990. – V. 18. – P. 1002-1007.
62. Brownell H.L., Narsimban R.P., Corbley M.J., Mann V.M., Whitfield J.F., Raptis L. Ras is involved in gap junction closure in proliferating fibroblasts or preadipocytes but not in differentiated adipocytes // *DNA Cell Biol.* – 1996. – V. 15. – P. 443-451.
63. Vanhamme L., Rolin S., Szpirer C. Inhibition of gap-junctional intercellular communication between epithelial cells transformed by the activated H-ras-1 oncogen // *Exp. Cell Res.* – 1989. – V. 180. – P. 297-301.
64. Best C.J., Tanzer L.R., Phelps P.C., Merriman R.L., Boder G.G., Trump B.F., Elliget K.A. H-ras transformed NRK-52E renal epithelial cells have altered growth, morphology and cytoskeletal structure that correlates with renal cell carcinoma in vivo // 1999. - *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* – 1999. – V. 35. – P. 205-214.
65. Clarke R.H. Control of low-level radiation exposure; what is the problem and how can it be solved? // *Health Phys.* – 2001. – V. 80. – P. 391-396.
66. Feinedegen L.E., Bond V.P., Sondhaus C.A., Altman K.I. Cellular signal adaption with damage control at low doses versus the prominence of DNA damage at high doses // *CR Acad. Sci III.* – 1999. – V. 322. – P. 245-251.
67. Little L.B. Induction of genetic instability by ionizing radiation // *Acad. Sci. Paris Ciencias de vie.* – 1999. – V. 322. – P. 127-134.
68. Morgan W.F., Day J.P., Kaplan M.I., McGhee E.M., Limoli C.L. Genomic instability induced by ionizing radiation // *Radiat Res.* – 1996. – V. 146. – P. 247-258.
69. Cox R. The role of animal models in the development of knowledge of radiation carcinogenesis and their potential contribution to judgements of risk at low doses // *Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie/Life Sciences.* – 1999. – V. 322. – P. 135-138.
70. Fujimoto H., Sasaki J., Matsumoto M., Suga M., Ando Y., Iggo R., Tada M., Saya H., Ando M. Significant correlation of nitric oxide synthase activity and

- p53 gene mutation in stage I lung adenocarcinoma // *Jpn. J.Cancer Res.* – 1998. – V. 89. – P. 696-702.
71. Maeda H., Akaike T. Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer // *Biochemistry.* – 1998. – V. 63. – P. 854-865.
 72. Newberry R.D., Stenson W.F., Lorenz R.G. Cyclooxygenase-2 – dependent arachidonic acid metabolites are essential modulators of the intestinal immune response to dietary antigen // *Nat. Med.* – 1999. – V. 5. – P. 900-906.
 73. Murata J., Tada M., Iggo R.D., Swamura Y., Abe H. Nitric oxide as a carcinogen: analysis by yeast functional assay of inactivating p53 mutations induced by nitric oxide // *Mutat. Res.* – 1997. – V. 379. – P. 211-218.
 74. Buckman S.A., Gresham A., Hale P., Hruza G., Anast J., Masferrer J., Pentland A.P. COX2 expression is induced by UVB exposure in human skin : implications for the development of skin cancer // *Carcinogenesis.* – 1998. – V. 19. – P. 723-729.
 75. Williams C.S., Mann M., Du Bois R.N. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer and development // *Oncogene.* – 1999. – V. 18. – P. 7908-7918.
 76. Gupta R.A., Du Bois R. Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2 // *Nature Rev. Cancer.* – 2001. – V. 1. – P. 11-21.
 77. Liggett W.H.J., Sidransky D. Role of p16 tumor suppressor gene in cancer // *J. Clin. Oncol.* – 1998. – V. 16. – P. 1197-1206.
 78. Serrano M. The INK4A/ARF locus in murine tumorigenesis // *Carcinogenesis.* – 2000. – V. 21. – P. 865-869.
 79. Rocco J.W., Sidransky D. p16 (MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression // *Exp. Cell Res.* – 2001. – V. 264. – P. 42-55.
 80. Guo S.X., Take T., Ohnishi H., Piao H.Y., Tabuchi K., Bessho F., Hanada R., Yanagisawa M., Hayashi Y. Hypermethylation of p16 and p15 genes and RB protein expression in acute leukemia // *Leuk. Res.* – 2000. – V. 24. – P. 39-46.
 81. Moller M.B. Frequent disruption of the Rb1 pathway in diffuse large B cell lymphoma: Prognostic significance of E2F-1 and p16^{INK4a} // *Leukemia.* – 2000. – V. 14. – P. 898-904.
 82. Merlo A., Herman J.G., Mao L., Lee D.J., Gabrielson E., Burger P.C., Baylin S.B., Sidransky D. 53pG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumor suppressor p16^{INK4a} /CDKN2/MTS1 in human cancers // *Nature Med.* – 1995. – V. 1. – P. 686-692.
 83. Read A.L. High frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4a) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma // *Cancer Res.* – 1996. – V. 56. – p. 3630-3633.
 84. Nguyen C., Liang G., Nguyen T.T., Tsao-Wei D., Groshen S., Lubbert M., Zhou J.H., Benedict W.F., Jones P.A. Susceptibility of non-promoter CpG island to de novo methylation in normal and neoplastic cells // *J. Natl. cancer Inst.* – 2001. – V. 93. – P. 1465-1476.

85. Hou M., Morishita Y., Ilima T., Inadome Y., Mase K., Dai Y., Noguchi M. DNA methylation and expression p16^{INK4a} gene in pulmonary adenocarcinoma and anthracosis in background lung // *Int. J. Cancer (Pred. Oncol.)*. – 1999. – V. 84. – P. 609-613.
86. Romanenko A., Morell-Quadreny L., Nepomnyaschy V., Vozianov A., Llombart-Bosch A. sclerosis proliferative atypical nephropathy of peritumoral tissue of renal cell carcinomas after the Chernobyl accident in Ukraine // *Virchows Arch.* – 2001. – V. 438. – P. 146-153.
87. Romanenko A., Morimura K., Wanibuchi H., Salim E., Kinoshita A., Kaneko M., Vozianov A., Fukushima S. Increased oxidative stress with gene alteration in urinary bladder urothelium after the Chernobyl accident // *Int. J. Cancer.* – 2000. – V. 86. – P. 790-798.
88. Saukkonen K., neiminen O., van Rees B., Vilkki S., Harkonen M., Juhola M., Mecklin J.P., Sipponen P., Restimaki A. Expression of cyclooxygenase 2 in dysplasia of the stomach in intestinal-type gastric adenocarcinoma // *Clin. Cancer Res.* – 2001. – V. 7. – P. 1923-1931.
89. Tanaka T., Iwasa Y., Kondo S., Hiai H., Toyokuni S. High incidence of allelic loss on chromosome 5 and inactivation of p15^{INK4b} and p16^{INK4a} tumor suppressor genes in oxystress-induced renal cell carcinomas in rats // *Oncogene.* – 1999. – V. 18. – p. 3793-3797.
90. Lundberg A.S., Weinberg R.A. Control of the cell cycle and apoptosis // *Europ. J. cancer.* – 1999. – V. 35. – P. 531-539.
91. Johnson D.G., Walker C.L. Cyclins and cell cycle signaling // *Cell Signal.* – 1999. – V. 11. – P. 1-14.
92. Gillett C.E., Barnes D.M. Cell cycle // *J. Clin. Pathol.* – 1998. – V. 51. – P. 310-316.
93. Adams P.D., Kaelin W.G. Negative control elements of the cell cycle in human tumors // *Curr. Op. Cell Biol.* – 1998. – V. 10. – P. 791-797.
94. Sherr C.J. The pezcoller lecture: Cancer cell cycles revisited // *cancer Res.* – 2000. – V. 60. – P. 3689-3695.
95. Carcnero A. Cell cycle and cancer // *Rev. Oncol.* – 2000. – V. 2. – P. 12-22.
96. Quelle D.E., Zindy F., Roussel M.F., Quelle D.E., Downing J.R., Ashmun R.A., Grosveld G., Sherr C.J. Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19^{ARF} // *Cell.* – 1997. – V. 9. – P. 649-659.
97. Esteller M., Tartola S., Toyota M., Capella G., Peinado M.A., Baylin S.B., Herman J.G. Hypermethylation – associated inactivation of p14^{ARF} is independent of p16^{INK4a} methylation and p53 mutation status // *Cancer Res.* – 2000. – V. 60. – P. 129-133.
98. Hartwell L.H., Kastan M.B. Cell cycle control and cancer // *Science.* – 1994. – V. 266. – P. 1821-1828.
99. Ushio-Fukai M., Alexander R.W., Akers M., Griendling K.K. p38 mitogenactivated protein kinase is a critical component of the redox-sensitive signaling pathway activated by angiotensin II // *J. Biol. Chem.* – 1998. – V. 73. – P. 15022-15029.

100. Wang X., Martindale I.L., Liu Y., Holbrook N.J. The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signaling pathways on cell survival // *Biochem. J.* – 1998. – V. 333. – P. 291-300.
101. Galibert M.D., Carreira S., Golding C.R. The Usf-1 transcription factor is a novel target for the stress-responsive p38 kinase and mediates UV-induced Tyrosinase expression // *EMBO J.* – 2001. – V. 20. – P. 5022-5031.
102. Kamata H., Hirata H. Redox regulation of cellular signaling // *Cell Signal.* – 1999. – V. 11. – P. 1-14.
103. Herrera B., Fernandez M., Roncero C., Ventura J.J., Porras A., Velladares A., Benito M., Fabregat I. Activation of p38MAPK by TGF-beta in fetal rat hepatocytes requires radical oxygen production, but is dispensable for cell death // *FEBS lett.* – 2001. – V. 499. – P. 225-229.
104. Vicker M.G., Bultmann H., Glade U., Hafker T. Ionizing radiation at low doses induces inflammatory reactions in human blood // *Radiat. Res.* – 1991. – V. 128. – P. 251-257.
105. Prasad A.V., Mohan N., Chandrasekar B., Meltz M.L. Activation of Nuclear factor kB in human lymphoblastoid cells by low-dose ionizing radiation // *Radiation Res.* – 1994. – V. 138. – P. 367-372.
106. Little J.B. Radiation carcinogenesis // *Carcinogenesis.* – 2000. – V. 21. – P. 397-404.
107. Wu L.J., Randers-Pherson G., Xu A., Waldren C.A., Geard C.R., Yu Z.L., Hei T.K. Targeted cytoplasmic irradiation with alpha particles induces mutations in mammalian cells // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1999. – V. 96. – P. 4959-4964.
108. Mothersill C., Rea D., Wright E.G., Lorimore S.A., Murphy D., Seymour C.B., Omalley K. Individual variation in the production of a bystander signal following irradiation of primary cultures of normal human urothelium // *Carcinogenesis.* – 2001. – V. 22. – P. 1465-1471.
109. Parvey S., Conroy S., Russell T., Gabrielli B. Ultraviolet radiation induces p16CDKN2a expression in human skin // *Cancer Res.* – 1999. – V. 59. – P. 4185-4189.
110. Martin J.M.C., Balkenede A., Verschoor T., Lallemand F., Michalides R. Cyclin D1 over-expression enhances radiation-induced apoptosis and radiosensitivity in a breast tumor cell line // *Cancer Res.* – 1999. – V. 9. – P. 1134-1140.
111. Gupta A., Rosenberg S.F., Bowden G.T. Increased ROS levels contribute to elevated transcription factor and MAP kinase activities in malignantly progressed mouse keratinocyte cell lines // *Carcinogenesis.* – 1999. – V. 20. – P. 2063-2073.
112. Suzuki K., Kodama S., Watanabe M. Extremely low-dose ionizing radiation causes activation of mitogen-activated protein kinase pathway and enhances proliferation of normal human diploid cells // *Cancer Res.* – 2001. – V. 61. – P. 5396-5401.

РАЗДЕЛ III. ХРОНИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ МАЛЫХ ДОЗ ИОНИЗИРУЮЩЕЙ РАДИАЦИИ НА УРОТЕЛИЙ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ ЧЕЛОВЕКА. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ ПАТОГЕНЕЗА “ЧЕРНОБЫЛЬСКОГО ЦИСТИТА”

А.Ф. Возианов, А.М. Романенко, Shoji Fukushima

С 1993 года по настоящее время Институтом урологии АМН Украины проводится постоянный мониторинг за больными с доброкачественной гиперплазией предстательной железы (ДГПЖ), у которых во время трансвезикальной аденомэктомии проводилась кодированная множественная биопсия слизистой оболочки стенки мочевого пузыря из его шейки, обоих устьев мочеточников и купола. Последующие гистологическое и иммуногистохимическое исследования проводились в 1993-1994 гг. совместно с отделом патологии (зав. – профессор Кристер Буш) Медицинского университета г. Упсала (Швеция), в 1995-1996 гг. – с отделом патологии (зав. – профессор Грегор Микуц) Медицинского университета г. Иннсбрук (Австрия). С 1996 года по настоящее время гистологическое, иммуногистохимические и молекулярно-генетические исследования множественных биоптатов мочевого пузыря у мужчин с доброкачественной гиперплазией предстательной железы и у женщин с хроническим циститом проводятся в отделе патологии (зав. – профессор Шоджи Фукушима) Медицинской школы Университета г. Осака (Япония).

Авторы приносят благодарность за участие в проведенных исследованиях сотрудникам урологической клиники Института урологии АМН. Украины канд. мед. наук В.К. Запарину, канд. мед. наук В.И. Винниченко, лаборатории Патологии того же Института канд. мед. наук Л.Б. Забарко, равно как и докторам отдела патологии Медицинской школы Университета г. Осаки (Япония) Кейчироу Моримуре, Шинджи Ямамото, Хидеки Ванибучи, Мин Вэю и Анне Киношита.

Алгоритм наблюдений в большей части исследований был идентичен: сопоставлялись данные, полученные у больных (I группа), проживающих в сильно загрязненных радионуклидами (от 5 до 30 Ки/км²) территориях Украины, с больными из г. Киев (II группа), где уровень радиации в почве был ниже (от 0,5 до 5 Ки/км²), и наконец, с больными,

проживающими в так называемых “чистых” регионах страны, где радионуклиды в почве не выявлялись, и которые составляли III (контрольную) группу (табл. 3.1).

Таблица 3.1. Характеристика пациентов

^a – использованы данные Raes et al. (1991);

^b – почва не загрязненная радионуклидами;

^c – курение на протяжении минимум 10 лет.

Параллельно у ряда больных всех трех групп перед операцией производилось радиометрическое измерение ^{137}Cs в суточной моче с использованием стандартного γ -радиометра РУБ-01. В качестве детектора использовался сцинтиляционный блок NaI с энергетической разрешающей способностью гамма-линии ^{137}Cs в 662 кэВ, что составляло 7,8 %. Гамма-спектр регистрировался в диапазоне 100-2200 кэВ. В качестве аналогоцифрового преобразователя использовался спектрометрический процессор ЕВТ-1.4 с программным усилителем, дискриминатором верхнего и нижнего уровней с числом дискредитации 1024. Калибровка спектрометра проводилась Украинским центром стандартизации и метрологии (УЦСМ). Пробы измерялись в сосудах Мари-нелли объемом 1-1,2 литра. Перед измерением проводилось определение фона с 1 литром чистой дистиллированной воды. Каждая проба измерялась трижды по 8 часов для определения средней квадратичной погрешности измерения.

Результаты радиометрического измерения уровня ^{137}Cs в суточной моче у больных всех трех групп приведены в таблице 3.2. Таблица подтверждает достоверное увеличение уровня ^{137}Cs у больных I (6,47 Бк/л) и в меньшей степени II группы (1,23 Бк/л) по сравнению с III группой (0,29 Бк/л) больных.

Таблица 3.2. Удельная активность ^{137}Cs в моче

^a – использованы данные Raes et al. (1991);

^b – почва не загрязненная радионуклидами;

^c – среднее значение \pm SD;

^d – достоверная разница с группой III, $p < 0,001$ (Steel type separate ranking test).

	Группа I	Группа II	Группа III
Количество исследуемых пациентов	55	53	12
Уровень радиационного загрязнения почвы [Ci/км ²] ^a	5-30	0,5-5	НЗ ^b
Удельная активность ^{137}Cs в моче [Бк/л]	6,47 \pm 14,30 ^{c,d}	1,23 \pm 1,01	0,29 \pm 0,03

ГЛАВА 3.1. Молекулы и гены, связанные с канцерогенезом (p53, cyclin D1, PCNA, p21^{WAF1/Cip1} и mdm2)

За последние 5 лет проблема хронического долговременного действия малых доз ионизирующего излучения привлекает все большее внимания.

Термин “малые дозы” означает уровень радиации, превышающий основной фон (0,1-0,5 Гр), однако ниже того уровня, который вызывает острое повреждение и смерть клетки [1]. Малые дозы ионизирующей радиации (ИР) известны как мутагены, а также, как источник свободных радикалов, образующихся благодаря окислительным процессам, которые мало отличаются от окислительных процессов, происходящих в нормальной клетке [2]. Последние работы показали, что низкие дозы ИР могут быть не только инициаторами канцерогенеза, но также его промотором и прогрессором, особенно в условиях постоянного продолжительного воздействия [3, 4].

При многостадийном канцерогенезе в мочевом пузыре злокачественная трансформация уротелия может проявляться очень рано – еще на генетическом уровне. Известно, что развитие и прогрессия опухолей “управляется” определенными генетическими повреждениями. При этом пролонгированное усиление пролиферативных процессов также ведет к канцерогенезу [5, 6]. Важная роль в канцерогенезе уротелия мочевого пузыря принадлежит мутациям гена, супрессирующего опухолевый рост *p53*, обычно проявляющимся в экзонах 5-8, что неоднократно было доказано как на клиническом, так и на экспериментальном материале [7, 8, 9, 10]. Кроме того, некоторые авторы отмечают, что ген *p53* является важным “геном-маркером” клеточного ответа на ИР [11]. В последние годы была определена также связь между пролиферативным клеточным ядерным антигеном (PCNA) и протеином гена *p53* [12]. Различия в локализации, интенсивности окраски PCNA при разных степенях дисплазии, раке *in situ*, а также в различных формах уротелиального рака подтверждает целесообразность использования этого антигена в качестве “маркера” синтеза ДНК и клеточной пролиферации при диагностике опухолей мочевого пузыря человека.

Важную регуляторную роль в прохождении клеточного цикла через G1-фазу играет циклин D1 (cyclin D1) вместе со своим каталитическим

партнером циклинзависимой киназой (CDK), которые фосфорилируют протеин гена ретинобластомы. Повышенная экспрессия циклина D1 в крысиных фибробластах сопряжена с их пролиферацией и малигнизацией, а в опухолях человека различного гистогенеза циклин D1 выполняет функцию онкогена [13, 14, 15, 16, 17]. В литературе недавно появилось также и первое сообщение о важной роли циклина D1 в качестве онкогена в развитии уротелиального рака мочевого пузыря, а также о корреляции его экспрессии со степенью атипичности и стадией опухоли [18]. В норме при прохождении клеточного цикла экспрессия циклина D1 индуцируется диким типом p53 протеина (WTrp53), что в свою очередь регулируется p21^{WAF1/Cip1} (известным также, как WAF1/Cip1), являющимся потенциальным CDK-ингибитором, блокирующим репликацию ДНК. Мутации гена p21^{WAF1/Cip1} обнаружены в различных новообразованиях, и в том числе недавно – при раке мочевого пузыря [19]. Еще один клеточный протоонкоген *mdm2* (murine-double-minute 2) оказался способным связывать p53 в качестве негативного регулятора, ингибирующего p53 зависимую транскрипционную трансактивацию. У человека экспрессия гена *mdm2* выявлена в саркомах мягких тканей, остеосаркомах и злокачественных опухолях мозга [20, 21, 22].

Таким образом, экспрессия перечисленных выше молекул и генов связана с развитием канцерогенеза и часто выявляется в различных злокачественных опухолях человека.

Гистологическое исследование биоптатов мочевого пузыря у лиц с ДГПЖ, проживающих на загрязненной радионуклидами территории Украины (больные I и II групп), выявило специфические, ранее не описанные морфологические особенности, которые можно было охарактеризовать, как хронический пролиферативный атипичный цистит или “чернобыльский цистит” [23, 24].

Характерным для этой патологии было появление множественных очагов дисплазии и рака *in situ*. В зонах дисплазии выявлялись значительные изменения в уротелии в виде клеточного полиморфизма, исчезновения полярности клеток, гиперхромазии ядер, часто сочетающихся с утолщением эпителиального пласта. Клетки были увеличены в размерах с расширенной цитоплазмой, укрупненными иногда множественными ядрышками. Очаги дисплазии выявлялись у 97 и 83 % больных из групп I и II, соответственно (табл. 3.1.1). Множественные очаги рака *in situ* в уротелии, гнездах фон Брунна, очагах кистозного

цистита определялись у 73 и 64 % больных из групп I и II, соответственно. Кроме того, у 9 больных из I и II групп были случайно обнаружены при гистологическом исследовании маленькие развивающиеся папиллярные или инвазивные уротелиальные карциномы. У женщин I и II групп диагностировался хронический цистит с зонами реактивной атипии (в 4 из 5 случаев) и дисплазия уротелия (в 2 из 5 случаев).

Таблица 3.1.1. Частота возникновения в мочевом пузыре дисплазии и рака

^a – рак *in situ*;

^b – уротелиальный рак;

^c – достоверная разница с группой III, $p < 0,0001$ (χ^2 or Fisher's exact probability test);

^d – дисплазия средней тяжести.

У всех больных, проживающих в загрязненных радионуклидами регионах Украины, включая г. Киев, обнаруживались различные формы пролиферативного цистита в виде гнезд фон Брунна, кистозного цистита, иногда с проявлениями плоскоклеточной или железистой метаплазии, которые часто сочетались друг с другом. При этом обращали на себя внимание обширные поля склероза, фиброза, а иногда гиалиноза соединительной ткани в lamina propria, в сочетании с выраженной активацией ангиогенеза с дилатацией и повышенным кровенаполнением предсуществующих кровеносных сосудов с образованием ангиоматоидно-подобных сосудов и весьма умеренной воспалительной инфильтрацией.

Повышенный уровень ангиогенеза с обширными кровоизлияниями отмечался у 62, 53 и 6 % больных I, II и III групп, соответственно. Пролiferация эндотелиальных клеток во вновь образованных мелких кровеносных сосудах в lamina propria была выражена у 46 и 34 % больных I и II групп. У женщин I и II групп, страдающих хроническим

циститом, также обнаруживались очаги склероза соединительной ткани в lamina propria в сочетании с гиперваскуляризацией и небольшими кровоизлияниями, однако уровень воспалительной инфильтрации их был довольно значительным.

Описанные выше изменения в уротелии и lamina propria мочевого пузыря, особенно ярко выраженные у мужчин с доброкачественной гиперплазией предстательной железы, проживающих в загрязненных радионуклидами регионах Украины, не соответствуют классическим описаниям острого и хронического радиационного цистита, которые не включают в себя изменения, развивающиеся при постоянном и долговременном (более 17 лет) действии малых доз ионизирующего излучения. Описанные в руководствах реактивные пролиферативные изменения в уротелии, сочетающиеся с отложением фибрина, фибриноидными васкулитами, появлением многоядерных стромальных клеток, характерные для действия высоких доз ИР, у наших больных отсутствовали.

Иммуногистохимическое исследование вышеупомянутых молекул и генов (онкогенов и генов, супрессирующих опухолевый рост) выявило весьма характерные изменения их экспрессии, свидетельствующие о выраженных нарушениях регуляции клеточного цикла, способствующих канцерогенезу.

Известно, что ИР вызывает арест клеточного цикла, что дает клетке дополнительное время для репарации поврежденной ДНК в фазах G1, G2 и, возможно, S-фазе. Ген *p53*, являющийся основной мишенью ИР, первым реагирует на облучение резким повышением уровня его экспрессии, что приводит к ингибированию синтеза ДНК. Следовательно, повреждение гена *p53* ведет к беспрепятственному воспроизведению поврежденной матрицы ДНК и к накоплению генетических дефектов в продуцируемом белке. Известно также, что дикий тип гена *p53* (*Wtp53*) играет важную роль в репарационных процессах поврежденной оксидативным стрессом (обусловленным ИР и некоторыми химическими канцерогенами) ДНК. У больных I и II групп отмечалось выраженное повышение уровня *p53*, PCNA, cyclin D1, *mdm2* и *p21^{WAF1/Cip1}* протеинов в уротелии мочевого пузыря, что можно, по-видимому, объяснить не только вовлечением их в процессы синтеза, но и репарации поврежденной ДНК (рис. 3.1.1-3.1.3).

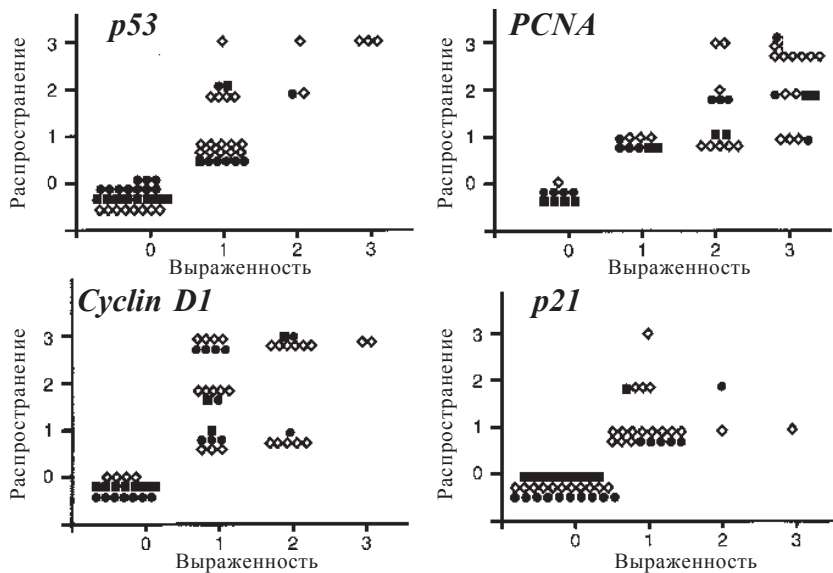


Рисунок 3.1.1. Результаты ИГХ-исследования больных групп I-III: ◇ – группа I (n=28), ● – группа II (n=17), ■ – группа III (n=10).

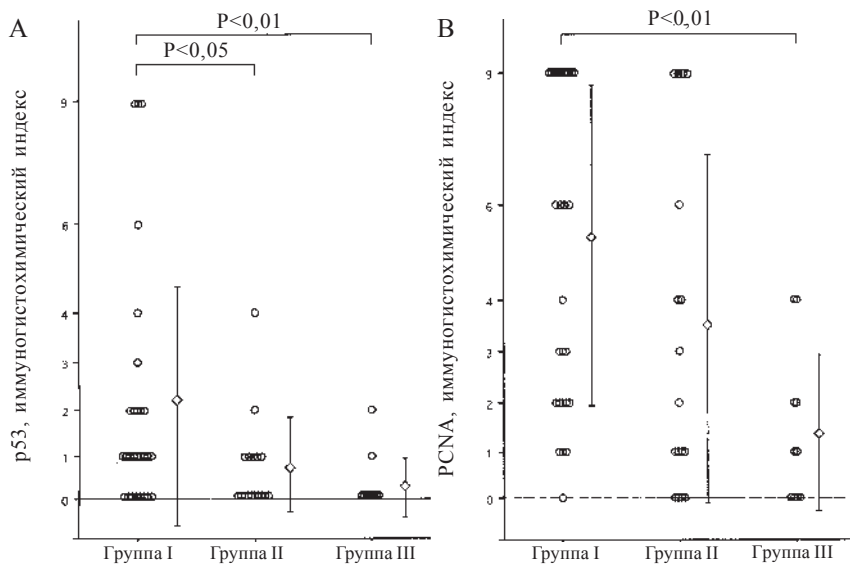


Рисунок 3.1.2. Иммуногистохимические индексы для уротелия мочевого пузыря у больных I-III групп: А – p53, В – PCNA.

А

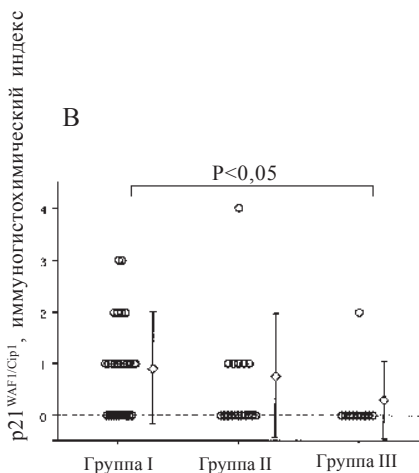
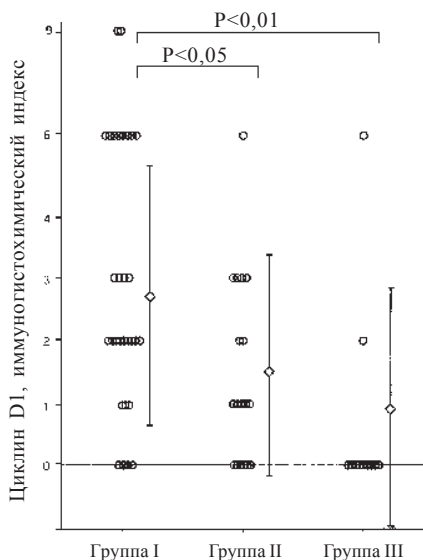


Рисунок 3.1.3. Иммуногистохимические индексы для уротелия мочевого пузыря у больных I-III группы: А – циклин D1, В – p21^{WAF1/Cip1}.

Активация *cyclin D1* и p21^{WAF1/Cip1} происходит в ответ на активацию дикого типа *p53*. Далее накопление *cyclin D1* отмечается в ядрах клеток достигающих G1-фазы и исчезает, когда клетки входят в S-фазу. Выделены по крайней мере две функции гена *p53* в процессе репарации ДНК: одна – осуществление контроля путем транскрипционной активации гена p21^{WAF1/Cip1} и другая – индукция апоптоза (рис. 3.1.4 и 3.1.5).

Можно предположить, что многолетняя постоянная (более 17 лет) экспозиция низкими дозами радионуклидов, и в частности ¹³⁷Cs, приводит к хроническому повреждению ДНК уротелия мочевого пузыря. Высокая и стойкая p53 иммунореактивность, обнаруживаемая в зонах дисплазии, рака *in situ* отражает мутации в гене *p53*, что было нами подтверждено в последующих молекулярно-генетических исследованиях с помощью полимеразной цепной реакции, в сочетании с анализом однонитчатого конформационного полиморфизма (PCR-SSCP-анализ).

Мутационная инактивация гена *p53* весьма характерна для многих опухолей человека. При раке мочевого пузыря мутации гена *p53* особенно характерны для инвазивных, высокой степени атипии опухолей

А

В

С

Д

Е

Ж

*Рисунок 3.1.4. Результаты иммуногистохимического анализа уротелия мочевого пузыря мужчин, подвергшихся длительному хроническому облучению малыми дозами радиации: А-Е – дисплазия; А – окраска г-э; В – p53 экспрессия; С – PCNA экспрессия; F-J – гнезда фон Брунна с раком *in situ*; F – окраска г-э.*

и связаны с дедифференцировкой и прогрессией таких новообразований [25, 26]. Spruck С.Н. et al. (1994) описал два пути развития канцерогенеза в мочевом пузыре с альтерацией гена *p53* на самых ранних стадиях дисплазии и рака *in situ* с последующим развитием непапиллярных инвазивных форм рака и возникновение мутаций гена *p53*

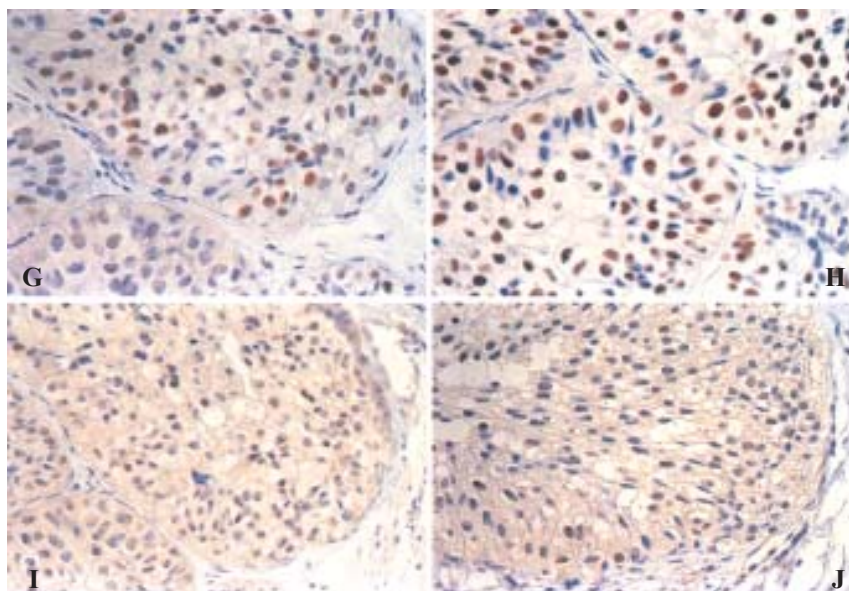


Рисунок 3.1.4 (продолжение). Результаты иммуногистохимического анализа уротелия мочевого пузыря мужчин, подвергшихся длительному хроническому облучению малыми дозами радиации: G – p53 экспрессия; H – PCNA экспрессия; I – cyclin D1 экспрессия; J – p21 WAF1/Cip1 экспрессия (увеличение A-E, $\times 90$; F-J, $\times 180$).

только в поздних стадиях папиллярного уротелиального рака. Таким образом, мутации гена *p53* в уротелии мочевого пузыря являются важным прогностическим фактором, особенно для инвазивных непапиллярных форм рака.

Мутационный анализ гена *p53* в ДНК, экстрагированной из уротелия больных, проживающих в загрязненных радионуклидами регионах Украины, выявил у 9 из 17 больных (53 %) единичные или множественные мутации (табл. 3.1.2). Выявленная частота *p53* мутаций характерна для инвазивного рака мочевого пузыря [27]. При этом преобладали перемещения G:C на A:T в CpG динуклеотидах (рис. 3.1.6 и 3.1.7). Идентичные мутации в экзонах 4-7 определялись не только в зонах дисплазии рака *in situ*, но и в осадках мочи тех же больных. В некоторых наблюдениях множественные мутации были неоднородными и встречались в разных кодонах, что позволяло думать о сильном

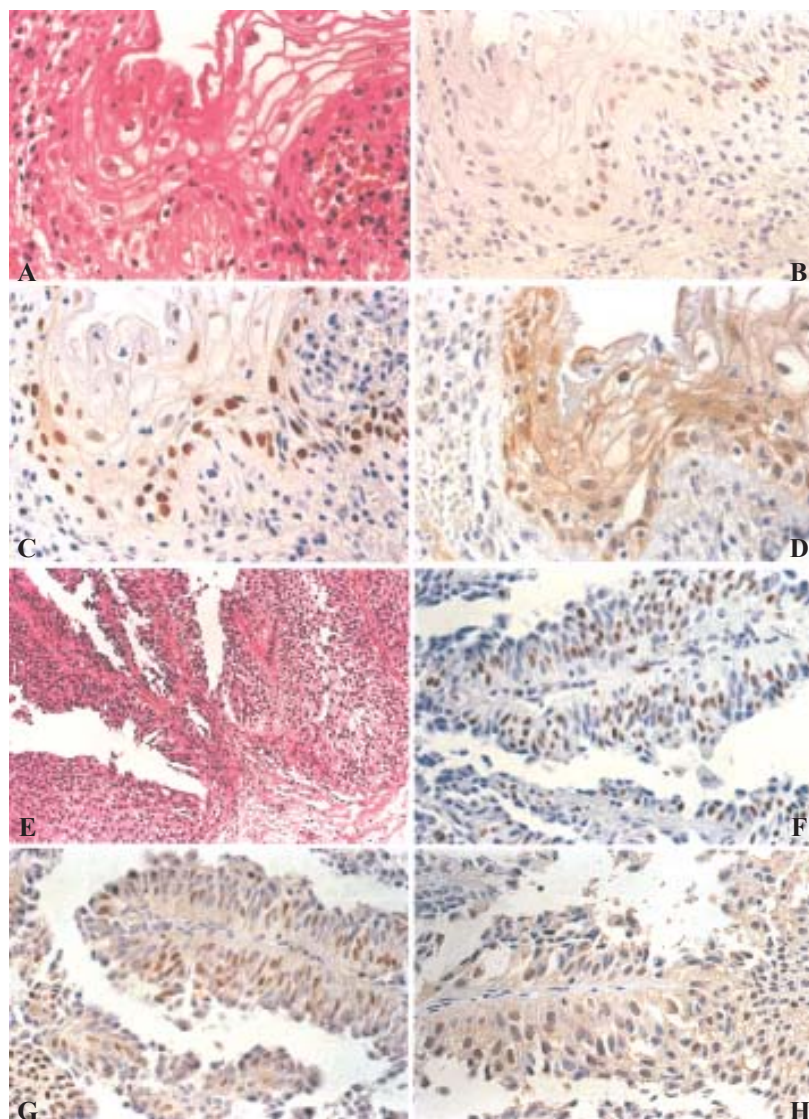


Рисунок 3.1.5. Результаты иммуногистохимического анализа: А-Д – плоскоклеточная метаплазия уротелия мочевого пузыря, А – окраска г-э; В – p53 экспрессия; С – PCNA экспрессия; D – suclin D1 экспрессия; Е-Н – уротелиальный рак, стадия 1. Е – окраска г-э; F – PCNA экспрессия; G – suclin D1 экспрессия; H – p21 WAF1/Cip1 экспрессия (увеличение А-Д и F-Н, $\times 230$; Е $\times 2$).

Таблица 3.1.2. Мутационный анализ гена *p53* уротелия мочевого пузыря пациентов, проживающих на загрязненных радионуклидами территориях Украины.

№	Возраст/ Группа	Дата иссле- до- вания	Мате- риал	Гистологи- ческий диагноз	Экзон	Кодон	Мутации гена <i>p53</i>		Переме- щения нуклеотидов
							Замещение оснований	Изменение последова- тельности АМК ^с	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	57 / I	02. 1997	биопсия	дисплазия ^а	нет				
2	69 / I	05. 1996	биопсия	дисплазия	нет				
3	60 / II	05. 1995	биопсия	дисплазия	нет				
4	74 / I	11. 1996	биопсия	CIS ^b	нет				
5	67 / I	03. 1996	биопсия	CIS	нет				
6	78 / II	05. 1996 07. 1997	биопсия моча	дисплазия	N.E. ^с нет				
7	69 / I	12. 1994	биопсия	дисплазия	нет				
8	68 / I	07. 1996	биопсия	дисплазия	нет				
9	66 / I	11. 1994	биопсия	дисплазия	7	251	ATC → CTC	Ile → Leu	A → C
10	63 / I	01. 1995	биопсия	CIS	7	245	GGC → AGC	Gly → Ser	G → A / CpG
11	73 / I	02. 1997	биопсия	инвазивный уротели- альный рак	5	158	CGC → CAC	Arg → His	G → A / CpG
12	68 / I	05. 1995 07. 1997	биопсия моча (SSCP)	CIS	N.E. 5	175	CGC → TGC	Arg → Cys	C → T / CpG

Продолжение табл. 3.1.2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
13	66 / I	03. 1995	биопсия	дисплазия	7	245	GGC→ AGC	Gly→ Ser	G→ A / CpG
			биопсия	CIS	7	245	GGC→ AGC	Gly→ Ser	G→ A / CpG
14	63 / I	01. 1997 07. 1997	биопсия	дисплазия	7	245	GGC→ AGC	Gly→ Ser	G→ A / CpG
			моча (SSCP)		7	245	GGC→ AGC	Gly→ Ser	G→ A / CpG
15	68 / I	07. 1996 08. 1997	биопсия моча (SSCP)	дисплазия	7 7	245 245	GGC→ AGC	Gly→ Ser	G→ A / CpG
16	69 / II	02.1997		дисплазия	5	154	GGC→ GGT	Gly→ Gly	G→T/ nonCpG
					7	245 ^d	GGC→ AGC	Gly→ Ser	G→ A / CpG
					7	254 ^d	ATC→ ACC	Ile→ Thr	T→ C
17	70 / I	05. 1995	биопсия	дисплазия	7	248	CGG→ TGG	Arg→ Trp	C→ T / CpG
			биопсия	CIS	5	158	CGC→ CAC	Arg→ His	G→ A / CpG
					7	248	CGG→ TGG	Arg→ Trp	C→ T / CpG
		08. 1997	моча	4	125 ^d	ACG→ ATG	Arg→ Met	C→ T / CpG	
				6	211 ^d	ACT→ ATT	Thr→ Ile	C→T/non-CpG	

^a – выраженность дисплазии – от средней до тяжелой;

^b – карцинома in situ;

^c – не оценивалось из-за недостаточного количества PCR-материала;

^d – тандемные мутации на идентичных аллелях;

^e – АМК – аминокислота.

Доказано, что вызванный радиацией “арест” G1-фазы клеточного цикла сопровождается повышением экспрессии p21^{WAF1/Cip1} протеина [29], что можно интерпретировать как проявление клеточной дифференцировки. Как известно, p21^{WAF1/Cip1} напрямую реагирует с PCNA, однако, по данным многих авторов, не ингибирует PCNA-зависимой репарации поврежденных нуклеотидов [12]. Это подтверждает возможность участия p21 не только в негативном контроле процессов клеточной пролиферации, но и в каких-то других не зависящих от гена *p53* процессах [30].

Около 75 % наших наблюдений (I и II групп) отличались высокой экспрессией cyclin D1, что может быть обусловлено активацией дикого типа *p53*, вследствие вызванного радиацией повреждения ДНК. Кроме того, в литературе имеются данные о повышенной экспрессии cyclin D1 у крыс при предраке мочевого пузыря, вызванном химическим канцерогеном N-бутил-N-(4-гидроксibuтил)-нитрозамином [18].

Значительное повышение уровня PCNA, обнаруживаемое не только в базальных, супрабазальных и поверхностных клетках уротелия, выявлялось в 88 % случаев I и II групп наблюдений, что свидетельствовало о его повышенной пролиферативной активности. Однако в последнее время появились сообщения об участии этого ядерного антигена в метаболизме нуклеиновой кислоты в качестве компонента при репликации в механизме репарации [31]. Встречаются также работы, подтверждающие участие некоторых онкогенов, и в частности семейства *ras*, на ранних стадиях канцерогенеза в мочевом пузыре [32]. Как известно, некоторые медиаторы воспаления, факторы роста и цитокины активируют *H-ras* [33]. Имеются данные и об экспрессии онкопротеина p21^{ras} в культуре уротелия мочевого пузыря под действием малых доз кобальт-60 γ -излучения [34]. Проведенное нами исследование выявило повышенную экспрессию протеина H-ras онкогена в ядрах уротелия больных I и II группы, по сравнению с III, контрольной группой больных, а также высокую иммунореактивность пролиферирующего эндотелия новообразованных сосудов и ангиоматозных разрастаний в lamina propria тех же больных. По данным литературы, H-ras экспрессия усиливается не только в условиях хронического воспаления под действием цитокинов и факторов роста, но и вследствие оксидативного стресса [35, 36]. В последней работе указывается также на важную роль H-ras в активации ангиогенеза, и в

частности, пролиферации эндотелиоцитов, что обусловлено негативным действием H-gas на экспрессию $\alpha 3\beta 1$ интегрина [37]. Таким образом, экспрессия H-gas в наших наблюдениях не только определяет онкогенную активацию уротелия, что особенно важно на ранних стадиях канцерогенеза мочевого пузыря, но и стимулирует ангиогенез через оксидативный стресс.

Таким образом, в ответ на хроническое многолетнее воздействие малых доз ионизирующего излучения в уротелии мочевого пузыря мужчин, страдающих накоплением остаточной мочи, вследствие ДГПЖ, отмечается значительное и стойкое повышение уровня экспрессии p53, cyclin D1, PCNA, mdm2 и в меньшей степени – p21^{WAF1/Cip1} в большинстве наблюдений, что сопровождалось появлением очагов дисплазии, рака *in situ* и даже маленьких, случайно обнаруженных, развивающихся уротелиальных карцином.



Фото 2. Группа исполнителей научного проекта, касающегося проблем рака мочевого пузыря в Украине у IV реактора ЧАЭС в сентябре 2001 года (слева-направо): канд. мед. наук Валентин Непомнящий, Dr. Keiichirou Morimura, Professor Shoji Fukushima, академик Алина Романенко.

ГЛАВА 3.2. Маркеры оксидативного стресса

Хроническое воспаление и хроническая инфекция давно известны, как факторы, способствующие развитию рака у человека [38, 39]. Предполагалось, что образующиеся под действием инфекции в воспалительно измененных тканях кислородные и азотистые соединения, играют важную роль в многофазном канцерогенном процессе. Оксид азота (NO), являющийся потенциально канцерогенным веществом со свойствами свободных радикалов, образуется из аргинина с помощью конститутивной или индуцибельной NO синтазы (iNOS) [40]. Биосинтез NO, а также супероксида, происходит в макрофагах и полиморфно-ядерных лейкоцитах, также как и в эндотелиальных клетках, чаще при наличии микробной инфекции, но и в случаях каких-то стрессов, например, X-лучей, Y-радиации или экспозиции химическим канцерогеном [2, 41]. Энзим iNOS эффективно катализирует реакции, генерирующие пероксинитрит, что вызывает повреждения ДНК и мутагенез [35]. Такое оксидативное повреждение ДНК является независимым фактором риска для развития рака. Воздействие радикалов кислорода и NO, эндогенно продуцируемых iNOS, могут вызывать канцерогенез [41, 42].

8-гидрокси-2'-дезоксигуанозин (8-OHdG) является одним из наиболее хорошо известных мишеней-маркеров оксидативного повреждения ДНК и участвует в канцерогенезе многих экспериментальных моделей [43].

Еще один возможный механизм, стимулирующий инициацию и промоцию канцерогенеза через оксидативный стресс – это образование простогландина, катализируемое ферментом циклооксигеназой (COX), который конвертирует арахидоновую кислоту в простогландины [44]. Известны два COX фермента: COX-1 и COX-2.

COX-2 является важным медиатором воспаления и очень рано реагирующим геном, синтез которого легко и быстро стимулируется опухолевыми промоторами и экспрессия которого коррелирует с агрессивностью опухоли [39]. Перечисленные выше iNOS, COX-2 и 8-OHdG могут служить хорошими маркерами оксидативного стресса в клетках и тканях. Результаты иммуногистохимического анализа маркеров оксидативного стресса представлены на рисунках 3.2.1 и 3.2.2.

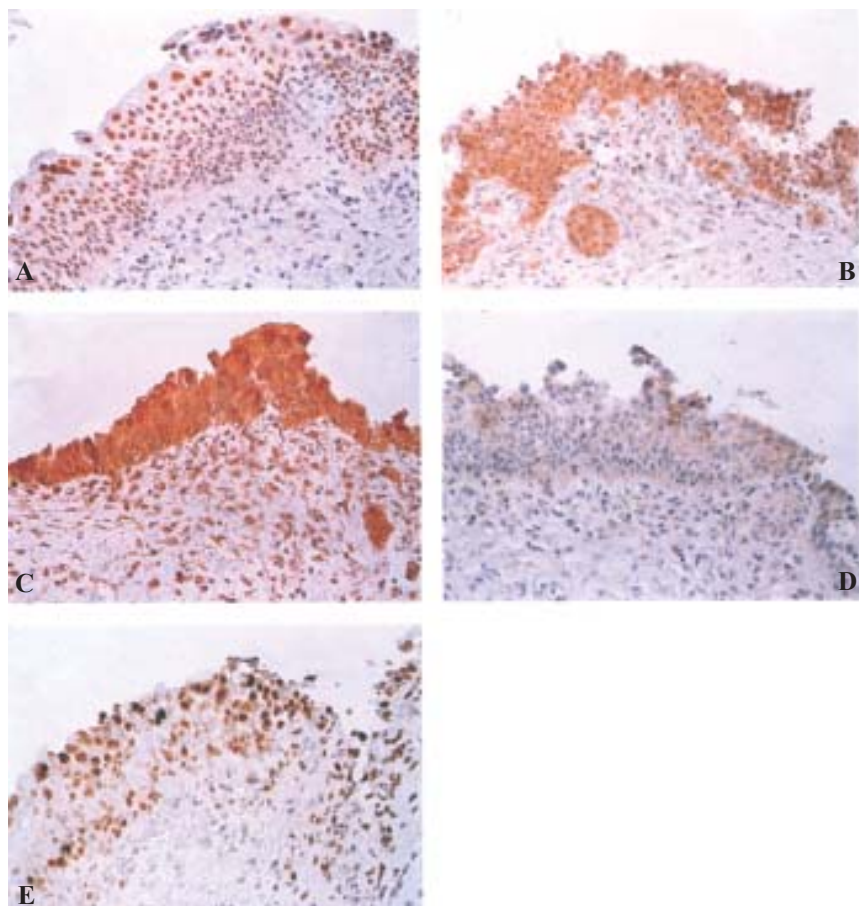


Рисунок 3.2.1. Результаты иммуногистохимического анализа уротелия больного из I группы с раком in situ: А – p53 экспрессия; В – Hras экспрессия; С – COX2 экспрессия; D – iNOS экспрессия; E – 8OHdG экспрессия. Увеличение $\times 100$.

Наши данные показали, что именно в уротелии больных I и II групп с высокой иммунореактивностью ядерного p53 отмечалось сильное окрашивание 8-OHdG в тех же ядрах, что сопровождалось цитоплазматическим окрашиванием iNOS и COX-2 (рис. 3.2.3). Встречающиеся иногда зоны слабой дисплазии, в сочетании с p53, 8-OHdG, COX-2 и iNOS экспрессией в уротелии больных из контрольной III группы,

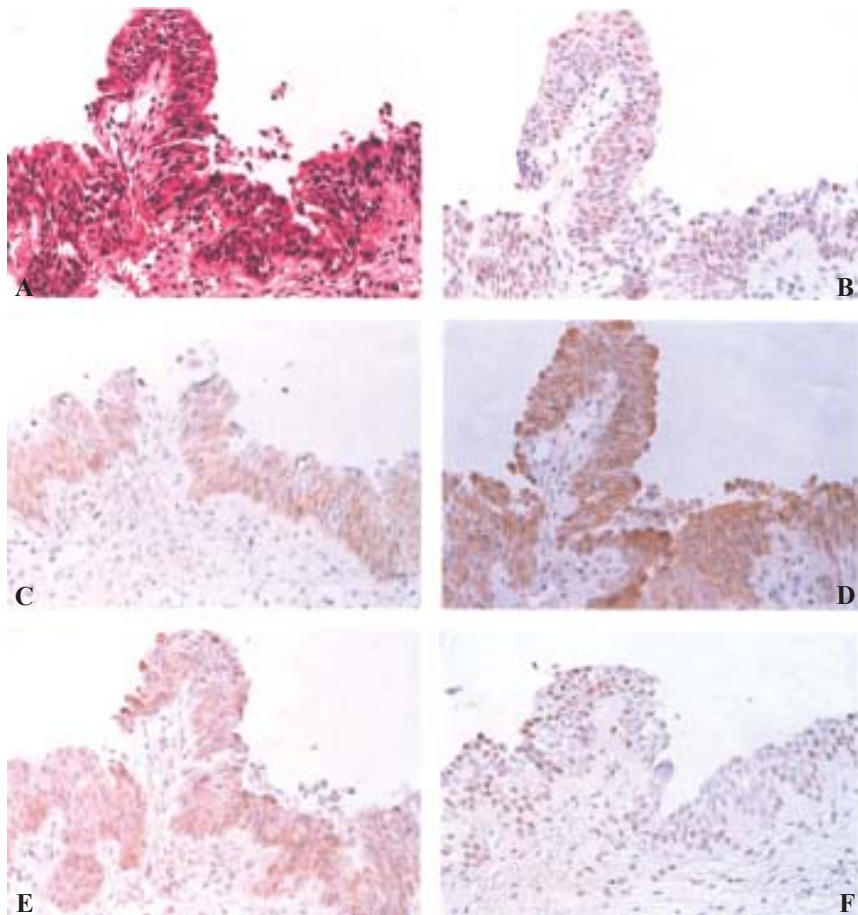


Рисунок 3.2.2. Результаты иммуногистохимического анализа больного из 1 группы с маленьким развивающимся уротелиальным раком на фоне тяжелой дисплазии уротелия: А – окраска г-э; В – p53 экспрессия; С – Hras экспрессия; D – COX2 экспрессия; E – iNOS экспрессия; F – 8OHdG экспрессия. Увеличение $\times 100$.

проживающих в так называемых “чистых” регионах Украины, можно объяснить тем, что это не совсем чистые зоны, так как еда, вода и почва легко могут быть загрязнены радионуклидами [45]. Это положение подтверждается одной из наших работ, где контрольная группа больных, проживающих на “чистых” территориях Украины, с

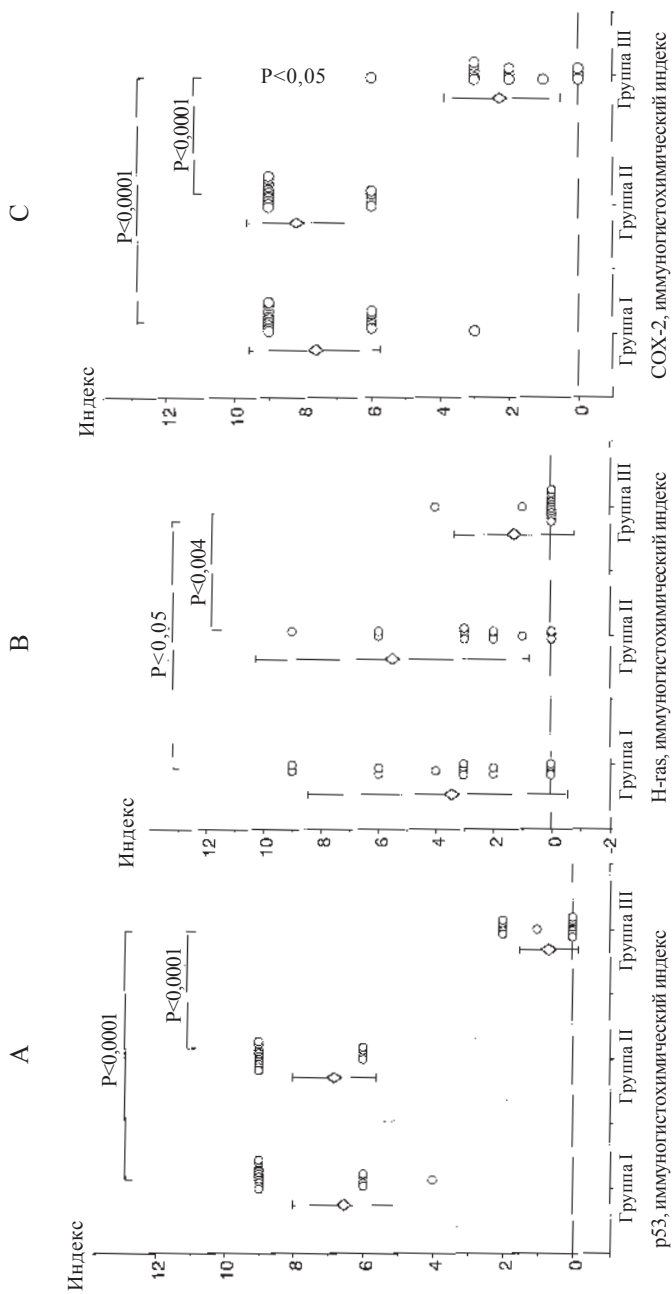


Рисунок 3.2.3. Иммуногистохимические индексы для уротелия мочевого пузыря больных I-III группами:
 А – p53; В – H-ras; С – COX2; D – iNOS; E – OHdG.

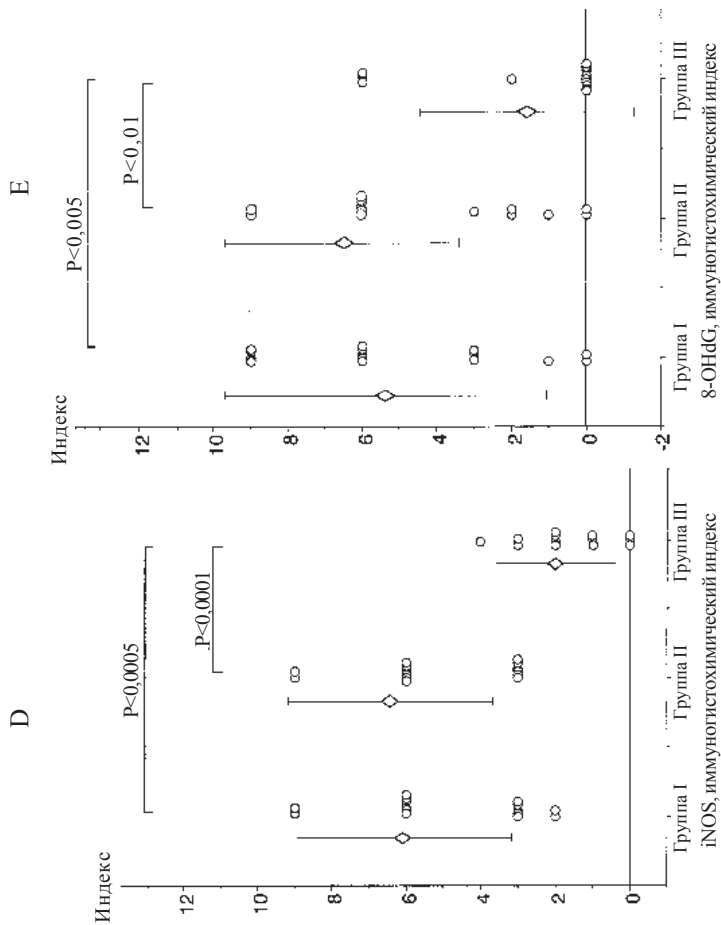


Рисунок 3.2.3 (продолжение). Иммуногистохимические индексы для уротелия мочевого пузыря больных I-III группы: А – p53; В – H-ras; С – COX2; D – iNOS; E – 8-OHdG.

повышенной экспрессией p53, mdm2 и PCNA в уротелии сопоставлялась с абсолютно аналогичными больными из Швеции и Австрии [46]. Наши данные подтверждают, что хроническое длительное воздействие малых доз ИР оказывает, по крайней мере, два эффекта на уротелий мочевого пузыря: 1) непосредственно индуцирует оксидативный стресс путем прямого воздействия на ДНК и ее повреждения, так как ИР, как известно, сама по себе является чистым источником свободных радикалов; 2) не прямое действие ИР на гомеостаз в уротелии с развитием последующего воспаления, с вытекающими отсюда последствиями в виде повышенной продукции NO (оксидативный стресс), что может повлечь за собой каскад онкогенных проявлений, инициированных, возможно, мутациями гена p53 в CpG динуклеотидах. Murata J. et al. (1997) показал, что NO индуцирует мутации и инактивирует p53, вызывая дезаминизацию цитозина, что приводит к G:C на A:T перемещениям *in vitro*. Результаты наших исследований, выявившие высокую экспрессию 8-OHdG, COX-2 и iNOS в сочетании с p53 мутационной инактивацией, с преобладанием G:C на A:T перемещений в CpG динуклеотидах, позволяют утверждать, что в уротелии наших больных I и II групп имеет место ДНК-дезаминация, индуцированная оксидативным стрессом.

Как уже упоминалось, малые дозы ИР являются не только мутагенами, но и генераторами свободных радикалов, образующихся путем оксидативных процессов, которые мало отличаются от процессов нормального окисления. Известно, что свободные радикалы, и в частности реактивные формы кислорода и оксид азота (NO), либо их производные, являются деноминаторами канцерогенеза [41, 42]. В то же время неясными остаются самые ранние и важнейшие механизмы, ведущие к активации транскрипционных процессов и экспрессии тРНК, что в конечном итоге приводит к пренеопластическим изменениям уротелия у лиц, живущих в радиационно загрязненных регионах Украины. При этом известно, что реактивные формы кислорода (РФК) могут служить активаторами или транскрипционными факторами, модулируя свою активность прямо или опосредованно путем активации различных сигнальных каскадов [47]. Одним из таких каскадов является p38 мутаген, активирующий протеинкиназный (МАПК) путь, который всегда первым активируется различными стрессовыми факторами, такими как ИР. Группа p38 МАПК-аз является семейст-

вом, входящим в состав суперсемейства мутагенактивирующих протеинкиназ. Прототипом этой группы является р38а (известный также, как р38, CSBP или Rk) – как часть наиболее раннего ответа на стресс, вызываемый такими агентами, как нагревание, ультрафиолетовое или радиационное излучения, цитокины, образующиеся при воспалении, являющиеся посредниками ингибиции клеточной пролиферации и вызывающие смерть клетки [48, 49].

Последние работы показали, что важную роль в каскаде оксидативного стресса играет активация транскрипционного фактора, ядерного фактора – каппа В (NF-kB), состоящего из двух основных субъединиц – полипептидов, р50 и р65, находящихся в цитоплазме клеток в виде неактивных предшественников в комплексе с ингибитором – каппа В. Стимулирующий импульс активирует разъединение этого комплекса с перемещением р50 и р65 полипептидов из цитоплазмы в ядро, где NF-kB связывается с ДНК и регулирует транскрипцию генов, ответственных за пролиферацию клеток, апоптоз и, наконец, онкогенез [50, 51]. Недавно было отмечено, что γ -излучение ^{137}Cs в малых дозах (1,17 Гр/мин) вызывает экспрессию NF-kB у предшественников В-лимфоцитов человека [52].

Проведенное нами иммуногистохимическое исследование выявило значительное увеличение экспрессии р38МАПК, р65 и р50 полипептидов NF-kB (рис. 3.2.4 и 3.2.5) в одних и тех же клетках уротелия и эндотелиальных клетках сосудов lamina propria больных I и II групп, что еще раз подтвердило важную роль оксидативного стресса в генезе изменений уротелия под долговременным действием малых доз ионизирующего излучения (рис. 3.2.6). Полученные результаты в сочетании с вышеизложенными данными о маркерах оксидативного стресса позволяют выделить два независимых направления или пути в генезе ранних изменений уротелия под хроническим действием малых доз ИР:

1. Цитоплазматическое накопление NF-kB с р65 и р50 полипептидами – как результат синтеза протеинов с активацией перемещения р65 и р50 субъединиц из цитоплазмы в ядро.
2. р38МАПК – зависимая трансактивация NF-kB.

Оба указанные направления на ранних стадиях оксидативного стресса ведут к максимальной активации NF-kB – зависимой транскрипции [53]. Такая концепция поддерживается имеющимися в

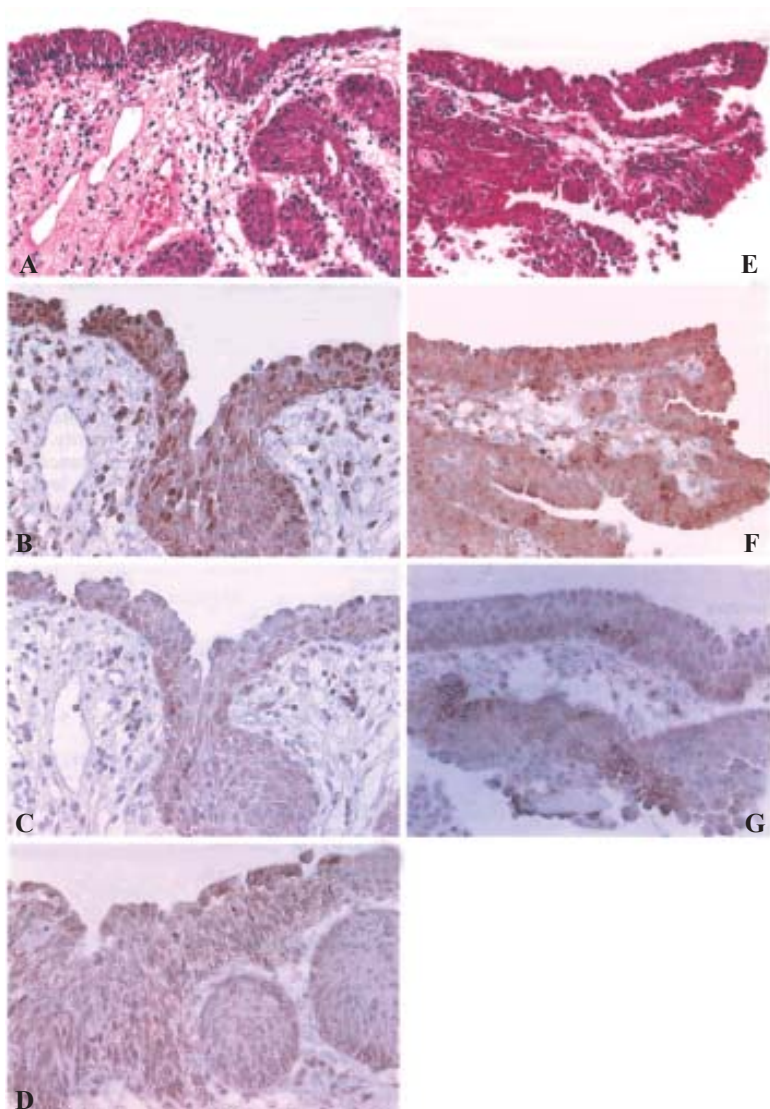


Рисунок 3.2.4. Результаты иммуногистохимического анализа уротелия больных с дисплазией (А-Д) и с маленьким уротелиальным раком (Е-Г) из I группы: А – окраска г-э; В – р65 экспрессия; С – р50 экспрессия; D – р38 МАРК экспрессия; Е – окраска г-э; F – р65 экспрессия; G – р50 экспрессия. Увеличение $\times 100$.

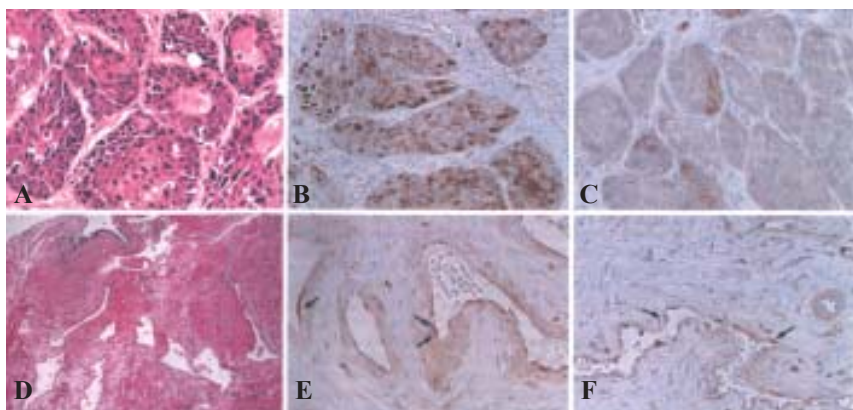


Рисунок 3.2.5. Результаты иммуногистохимического анализа уретерия больного с раком in situ и плоскоклеточной метаплазией гнезд Брунна с инвазией из II группы (А-С) и ангиоматозным расширением кровеносных сосудов (D-F) со склерозом lamina propria: А – окраска г-э; В – р65 экспрессия; С – р50 экспрессия; D – окраска г-э; E – р65 экспрессия; F – р38 МАРК экспрессия. Увеличение×100.

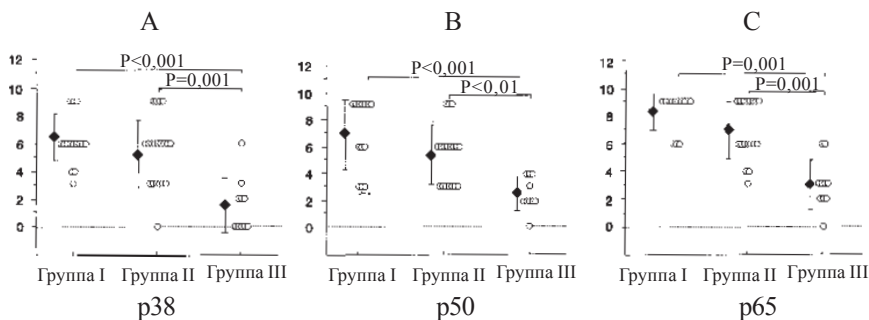


Рисунок 3.2.6. Иммуногистохимические индексы для уретерия мочевого пузыря больных I-III группы: А – р38 МАРК; В – р50; С – р65.

литературе данными о том, что γ -лучи ^{137}Cs в низких дозах (до 1,17 Гр/мин) модулируют связывание NF- κ B с ДНК в лимфоцитах человека с различной регуляцией уровней протеинов – субъединиц NF- κ B. Наши данные подтвердили также важную роль p38 MAPK каскада и субъединицы p65 NF- κ B в активации ангиогенеза, который, как оказалось, является важным компонентом в патогенезе “чернобыльского цистита”.

ГЛАВА 3.3. Нарушения репарации поврежденной ДНК

Понимание долговременного действия малых доз ИР требует учета последствий радиационного повреждения ДНК, что подразумевает изучение процессов ее репарации и выявление последствий “ошибок” в репарации, либо полностью ее отсутствия. Реактивные формы кислорода (РФК), генерируемые ИР, являются генотоксическими, так как они влияют на дезоксирибозу и нуклеотидные основания ДНК и вызывают множественные повреждения оснований и разрывы цепи ДНК [54]. Повреждение пуринового 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозина (8ОНdG) является наиболее важной и хорошо изученной формой оксидативного повреждения ДНК и служит своеобразным его маркером [43]. У млекопитающих невосстановленный 8ОНdG в ДНК является высокомутагенным соединением, вызывающим G:C на T:A перемещения в нуклеотидах [55].

Известны два способа эксцизионной репарации клеток у млекопитающих: нуклеотидная и эксцизионная репарация оснований [56].

Нуклеотидная эксцизионная репарация может успешно элиминировать поврежденные крупные участки ДНК, а также восстанавливает поврежденную кислородными радикалами ДНК [57]. Существуют два типа нуклеотидной эксцизионной репарации: битранскрипционная и полная геномная репарация. Одним из наиболее известных ферментов, который “отрезает” конец поврежденной ДНК при обеих битранскрипционной и полной геномной эксцизионной репарациях, является продукт группы А гена *xeroderma pigmentosum* (ХРА) – эндонуклеаза [58].

Для репарации 8ОНdG и других поврежденных РФК бактерий и клеток млекопитающих существует механизм эксцизионной репарации оснований, при котором поврежденные оксидативными или щелочными агентами основания убираются специфическими ДНК-гликозилазами, оставляющими пустые (без оснований) участки, которые затем “отсекаются” апуриновыми/апиримидиновыми эндонуклеазами [59]. Поврежденные РФК основания 8ОНdG в ДНК убираются 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазой (OGG1-8). У человека ген OGG1 имеет две формы: α -OGG1 и β -OGG1. С помощью иммуногистохимического анализа было доказано, что α -форма локализуется в ядре, в то время как β -форма обнаруживается в митохондриях [60]. Протеин OGG1 участвует в

репарации 8OHdG хромосом двойной спирали ДНК и постоянно экспрессируется как раковыми, так и нераковыми клетками человека.

Ферменты OGG катализируют гидролиз N-гликозил-соединений между основаниями, а также основу фосфатных сахаров в апуриновых/апиримидиновых сайтах ДНК, которые являются потенциально мутагенными, так что они могут использоваться для генерации ЗУН, необходимых для полимеризации и связывания [61].

Уничтожение безпуриновых/безпиримидиновых сайтов модулируется апуриновой/апиримидиновой эндонуклеазой, что сопровождается “вырезанием” 5' дезоксирибозно-фосфатных половинок [62]. Основной апуриновой/апиримидиновой эндонуклеазой в клетках человека является апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза 1 (APE1), ее также называют APEX, HAP1 и Ref1, которая, как известно, активируется в том числе и сублетальными дозами РФК из различных источников, включая ИР [63].

Несомненно, механизмы репарации ДНК, особенно эксцизионной репарации ее оснований, вызванной РФК, хронически продуцируемыми малыми дозами ИР, должны играть важную роль в канцерогенезе мочевого пузыря у лиц, проживающих более 17 лет в загрязненных радионуклидами регионах Украины.

Проведенное нами иммуногистохимическое исследование вышеупомянутых 8OHdG и ферментов, участвующих в репарации поврежденной ДНК, выявило для больных I и II группы средние коэффициенты иммунореактивности для 8OHdG – 4,1 и 1,6, для OGG1 – 5,8 и 2,4, для APE1 – 6,3 и 3,7 и для ХРА – 5,1 и 1,8, соответственно (рис. 3.3.1). В большинстве наблюдений I группы выявлялось средней и высокой степени гомогенное равномерное окрашивание ядер 8OHdG, APE1 и ХРА в базальном и промежуточном компартментах уротелия, особенно ярко выраженное в поверхностных клетках. Сильное гранулярное или гомогенное цитоплазматическое OGG1 окрашивание обнаруживалось в промежуточных клетках, оно было еще более интенсивным в поверхностных слоях уротелия. Зоны дисплазии и рака *in situ* ярко окрашивались 8OHdG, OGG1 и APE1 и ХРА с коэффициентами иммунореактивности 9 и 6, соответственно. Папиллярные и инвазивные случайно выявленные уротелиальные карциномы имели коэффициент иммунореактивности 2 для OGG1 и негативно окрашивались для всех остальных маркеров. Ядра макрофагов, плазматических

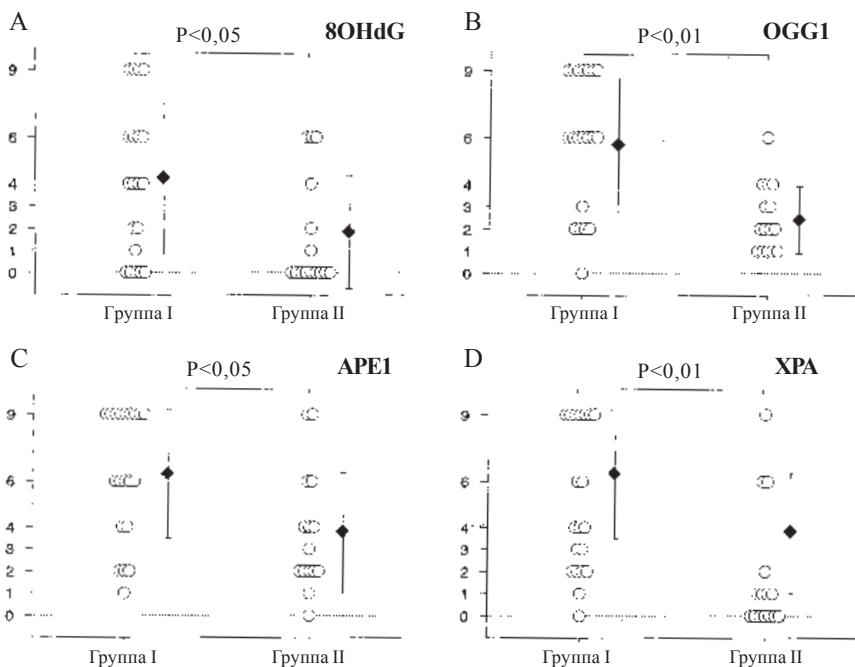


Рисунок 3.3.1. Иммуногистохимические индексы в уротелии мочевого пузыря группы I и группы II: А – 8OHdG; В – OGG1; С – апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза 1 (APE 1); D – xeroderma pigmentosum A (XPA). Столбики отображают положительное и отрицательное стандартное отклонение. Mann-Whitney U test p values.

и эндотелиальных клеток микрососудов в lamina propria, особенно вблизи уротелия, отличались высокой иммунореактивностью 8OHdG, APE1 и XPA.

Результаты наших исследований подтвердили, что окислительный стресс, проявляющийся в уротелии мочевого пузыря у больных, проживающих в радиационно загрязненных регионах Украины, сопровождается повреждением ДНК и ее репарацией. 8OHdG, являясь высокомуtagenным соединением – маркером окислительного повреждения оснований ДНК, характеризуется единственной и даже эксклюзивной выраженностью эксцизионной репарации оснований с использованием α - и β -OGG1 ДНК и гликозилаз/APE лизиса [61].

Высокий уровень 8OHdG и достоверное повышение в тех же клетках уротелия OGG1 и APE1 у больных I группы подтверждает повреждение ДНК и активацию эксцизионной репарации ее оснований. По данным литературы, ген *p53 in vivo* моделирует эксцизионную репарацию оснований ДНК, поврежденных оксидативным стрессом, обусловленным ИР [64], что подтверждает важную роль эксцизионной репарации оснований в молекулярных взаимодействиях между протеином p53 и механизмами восстановления ДНК. Наши данные о высокой экспрессии ферментов эксцизионной репарации оснований ДНК в зонах уротелиальной дисплазии или рака *in situ* подтверждают предположение о том, что мутированный ген *p53* требует наиболее высокой активности эксцизионной репарации оснований в ответ на оксидативный стресс [65].

Активность ферментов эксцизионной репарации оснований в уротелии больных I группы была нерегулярной. Мозаичная, преимущественно цитоплазматическая, β -OGG1 экспрессия, выявляющаяся, главным образом, в поверхностных слоях клеток уротелия, в сочетании с высоким уровнем 8OHdG в ядрах этих же клеток указывает на неэффективную эксцизионную репарацию в них оснований ДНК. В то время уровень ядерной экспрессии APE1-основной эндонуклеазы, “работающей” в апуриновых/апиримидиновых сайтах после облучения ИР, был высоким и гомогенным.

Недавно повышение экспрессии APE1 было приведено в качестве доказательства повышенной клеточной резистентности к оксидативным агентам [59], способствующей эксцизионной репарации оснований ДНК, поврежденной реактивными формами кислорода. Наши данные подтвердили участие APE1 в репарации оксидативно поврежденной ДНК уротелия человека в результате длительного воздействия малых доз ИР. Значительное увеличение ядерного протеина xeroderma pigmentosum A в уротелии больных I группы свидетельствовало об активации обеих нуклеотидных репараций (транскрипционной и полной геномной) [58]. В последних работах отражена ведущая роль протеина xeroderma pigmentosum A на ранних стадиях нуклеотидной эксцизионной репарации в ответ на действие малых доз (0,2-2 Гр) ИР [66].

Интересно, что повышение ядерной 8OHdG, APE1 и ХРА, но не OGG1, обнаруживалось в эндотелии микрососудов, макрофагах и

лимфоцитах, расположенных вблизи уротелия, что указывало на репарационные процессы и в ДНК в lamina propria. Необходимо отметить также, что все маленькие инвазивные уротелиальные раки, случайно выявленные у больных I группы, были негативными для OGG1, APE1 и XPA, что, по-видимому, свидетельствовало о поломке репарационных механизмов в раковых клетках. Причины отсутствия оксидативного повреждения в уже развившихся злокачественных новообразованиях не совсем понятны и требуют своего дальнейшего разъяснения.

Полученные нами результаты указывают на достоверную связь между оксидативным стрессом, индуцированным длительным, непрерывным воздействием малых доз ИР на уротелий мочевого пузыря, и выраженной активацией репаративных процессов в ДНК, в качестве раннего ответа, и попытку восстановить клеточный гомеостаз. Однако наши данные показали, что репарация ДНК (оба ее пути: эксцизионная нуклеотидная и эксцизионная репарация оснований), особенно в зонах дисплазии и рака *in situ*, была неэффективной и несостоятельной, и поэтому ее скорее следует оценивать как процесс, только способствующий канцерогенезу.

ГЛАВА 3.4. Экстрацеллюлярные и мембранозные молекулярные повреждения

Восстановительные гомеостатические процессы в микроокружающей среде, связанные с различными внеклеточными сигнальными системами через взаимодействие клеток друг с другом и с экстрацеллюлярным матриксом, могут служить мишенью для хронического воздействия малых доз ИР. Такие межклеточные взаимоотношения, в свою очередь, модулируются цитокинами, факторами роста, которые, являясь полифункциональными молекулами оркестрирующими различные стороны воспалительного ответа, проявляют свое воздействие локально либо системно аутокринным либо паракринным путем [67, 68].

Трансформирующий фактор роста $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) относится к цитокинам и принадлежит у суперсемейству TGF- β , в состав которого входят мультифункциональные цитокины, регулирующие рост клеток, их дифференцировку, тканевую перестройку, иммунный ответ и ангиогенез [69]. У млекопитающих семейство TGF- β состоит из трех основных изоформ: TGF- $\beta 1$, TGF- $\beta 2$ и TGF- $\beta 3$ [70]. У большинства клеток они функционируют через трансмембранные рецепторы серин/тиониновых киназ типа I и II [71]. TGF- $\beta 1$ известен, как экстрацеллюлярный сигнальный сенсор на повреждение, играющий важную роль в канцерогенезе. При воздействии малых доз ИР, рост клеток начинается с образования реактивных форм кислорода (РФК). Примером может служить облучение радоном нормальных фибробластов человека, стимулирующее мгновенный рост уровня TGF- $\beta 1$, вызывающее затем активацию клеточных мембран фибробластов, связанных с НАДФ-оксидазой, что, в свою очередь, ведет к росту клеточной пролиферации и играет важную роль в канцерогенезе, индуцированном радоном [72].

TGF- $\beta 1$ является доминирующей изоформой в ткани и клетках мочевого пузыря, и его уровень резко возрастает при поверхностных и инвазивных уротелиальных опухолях [73].

В последнее 10-летие в прогрессии многих опухолей человека большое внимание уделяется альтерации кадхерин-катениновых комплексов. Суперсемейство гена кадхерина содержит более 40 представителей, продуцирующих трансмембранные протеины, регулирующие кальцийзависимую межклеточную адгезию [74]. Эпителиальный (E)-кадхерин играет важную роль в опухолевой прогрессии во многих

опухолях человека через межклеточную гомофильную Ca^{2+} -зависимую адгезию. Такая адгезия регулируется группой цитоплазматических протеинов, включая α -, β -, и γ -катенины, которые привязываются к актину цитоскелета E-кадхерина [75]. β -катенин является ключевым регулятором Wnt (Wingless signal transduction) – сигнального каскада, отвечающего за контроль над экспрессией генов, повреждением клеток, их адгезией и полярностью [76]. В некоторых работах было показано, что потеря либо уменьшение уровня экспрессии как E-кадхерина, так и катенина влияет на клинико-патологические свойства опухолей мочевого пузыря, и E-кадхерин может служить прогностическим маркером при канцерогенезе мочевого пузыря [77].

В связи с этим мы попытались изучить у одних и тех же больных с развивающимся вследствие хронического действия малых доз ИР, вызывающих оксидативный стресс в уротелии мочевого пузыря, “чернобыльским циститом” состояние компонентов E-кадхерин/ β -катенинового комплекса, а также экспрессию TGF- β 1 и iNOS, что позволило бы судить о молекулярных повреждениях клеточных мембран и понять их роль в патогенезе “чернобыльского цистита”. При этом группа I объединяла всех больных, проживающих в загрязненных радионуклидами регионах Украины, включая г. Киев, а II группа была контрольной, в нее входили больные из так называемых “чистых” зон Украины.

Иммуногистохимические индексы экспрессии в слизистой оболочке мочевого пузыря TGF- β 1, iNOS, β -катенина и E-кадхерина представлены на рисунках 3.4.1 и 3.4.2. Статистически достоверные различия в экспрессии TGF- β 1 как в уротелии, так и в lamina propria, iNOS только в уротелии, а также цитоплазматического β -катенина и E-кадхерина в уротелии, выявлены между группами I и II ($p < 0,001$, $p < 0,001$, $p < 0,001$, $p < 0,005$, $p < 0,01$), соответственно. Однако достоверные различия отсутствовали в экспрессии β -катенина и E-кадхерина мембранозной локализации в группах I и II. При этом высокая экспрессия iNOS и TGF- β 1 (коэффициенты 6-9) как в цитоплазме, так и в клеточных мембранах обнаруживались у 22 (62,7 %) и 12 (35 %) из 35 исследованных больных, соответственно. TGF- β 1 экспрессия (коэффициенты 9-6) отмечалась также в эндотелиальных клетках и фибробластах lamina propria. Особенно сильное гомогенное окрашивание TGF- β 1 обнаруживалось у 88,4 % больных I группы в зонах склероза и фиброза lamina propria вблизи уротелия.

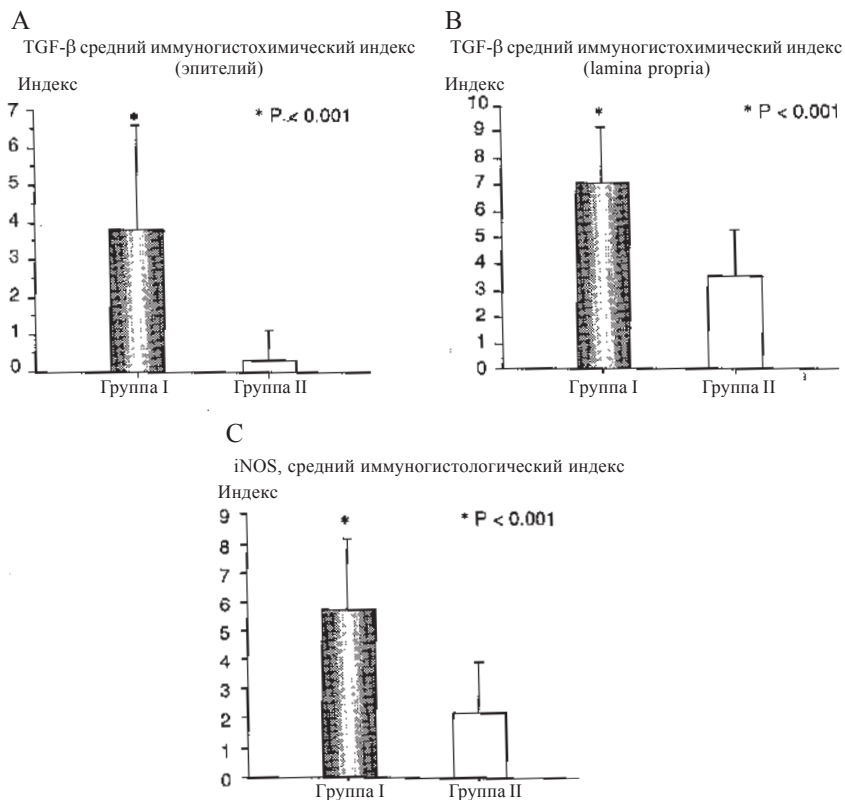


Рисунок 3.4.1. Средние иммуногистологические индексы для препаратов мочевого пузыря в группах I и II: А – TGF-β1 (уротелий); В – TGF-β1 (lamina propria); С – iNOS.

Высокая иммунореактивность β-катенина определялась в цитоплазме уротелия больных I группы. Так, она выявлялась в цитоплазме у 28 (80 %) из 35 больных I группы. Аналогичные корреляции отмечались в отношении иммунореактивности E-кадгерина (коэффициенты 9 и 6) как в мембранах, так и несколько реже в цитоплазме у 13 (37 %) больных той же группы. У больных II, контрольной, группы преобладало мембранозное окрашивание β-катенина и E-кадгерина с коэффициентами иммунореактивности 6 и 9 во всех 11 (100 %) наблюдениях и 8 (72,6 %), соответственно. Распространенность окрашивания E-кадгерина и β-катенина в зонах дисплазии и рака *in situ* была идентичной.

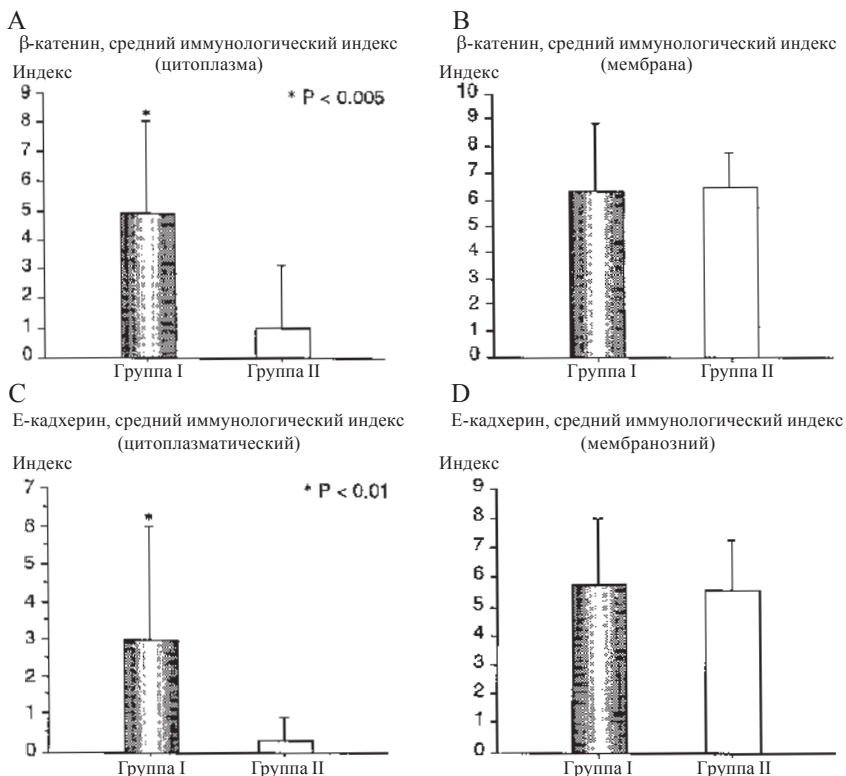


Рисунок 3.4.2. Средние иммуногистологические индексы для препаратов мочевого пузыря в группах I и II: А – β -катенин (цитоплазма); В – β -катенин (мембрана); С – E-кадхерин (цитоплазматический); Д – E-кадхерин (мембранозный).

У больных же контрольной группы гомогенное окрашивание E-кадхерина и β -катенина выявлялось преимущественно в базальных слоях уротелия. В зонах дисплазии и рака *in situ* выявлялась высокая экспрессия (коэффициент 9) преимущественно цитоплазматического β -катенина, E-кадхерина и более слабая экспрессия (коэффициент 9-4) для TGF- β 1 и iNOS. Папиллярные и инвазивные маленькие уротелиальные карциномы отличались очень низкой экспрессией (от 0 до 2) для TGF- β 1, iNOS, β -катенина и E-кадхерина с преобладанием цитоплазматической локализации. Особенно слабое окрашивание E-кадхерина и β -катенина отмечалось в зонах инвазивного роста, на границе опухоли.

Во всех опухолях TGF- β 1 и iNOS экспрессия не определялась. Кровеносные сосуды, эндотелиальные, плазматические клетки, гистиоциты, выявляли мембранозное окрашивание на iNOS, β -катенин и E-кадгерин.

Проведенное исследование впервые позволило утверждать, что развитие “чернобыльского цистита”, ассоциированного с дисплазией уротелия и раком *in situ*, а также с развитием фиброза в lamina propria, сопровождается активацией TGF- β 1 и разрушением E-кадгерин/ β -катениновых комплексов. Такие изменения, по-видимому, индуцированы оксидативным стрессом, развивающимся вследствие хронического действия ИР, и могут играть определенную роль в патогенезе рака мочевого пузыря.

Хроническое воспаление давно рассматривалось, как фактор риска в развитии рака мочевого пузыря [78]. Постоянное и долговременное радиационное излучение ведет к хроническому воспалению, часто сопровождающемуся повреждением ткани в связи с постоянной продукцией потенциальных оксидантов, генерирующих реактивные формы кислорода (РФК) и оксид азота (NO) [3]. Свободные радикалы, NO и iNOS повреждают ДНК клеток, и такое продолжительно повторяющееся повреждение может вызвать развитие предраковых состояний. Значительно повышенный уровень iNOS в уротелии мочевого пузыря у наших больных I группы, еще раз подтверждает наши прежние данные о развитии оксидативного стресса у таких больных [23].

Если высокий уровень продуцируемых РФК повреждает ДНК, то низкие их уровни воздействуют, главным образом, на способность к модуляции восстановительных процессов (redox modulation) [79]. TGF- β 1, как наиболее важный экстрацеллюлярный сенсор повреждения и сигнальный регулятор редокс-гомеостаза клеток, отвечает за межклеточные коммуникации [67, 80]. Интересно также, что TGF- β 1 является медиатором клеточного ответа на ИР, обеспечивая при этом тканевой ответ на оксидативный стресс [81].

Полученные нами данные указывают на повреждение TGF- β 1 в уротелии больных I группы; характерным было окрашивание TGF- β 1 преимущественно поверхностных слоев с уменьшением его в зонах дисплазии и рака *in situ*. В противоположность этому, уротелиальный рак или рак *in situ* с микроинвазией не содержит TGF- β 1. Особого внимания заслуживает высокая иммунореактивность в зонах склероза и фиброза lamina propria, включая эндотелиальные клетки, лимфоциты и фибробласты. Эти клетки являются ключевыми при развитии фиб-

роза в условиях ИР, так как известно, что повреждение регуляции выработки воспалительными клетками цитокинов после воздействия ИР, обычно приводит к фиброзу [68]. ИР является одним из немногих экзогенных агентов, способных вызывать латентную TGF- β 1 активацию *in situ*. Известно также, что щелевые межклеточные контакты (GJCs) являются очень чувствительной мишенью при оксидативном стрессе [82]. Кадхерин/катениновые комплексы служат для формирования щелевых контактов и обеспечения межклеточных соединений [83]. Поэтому повреждение экспрессии кадхерина либо всего комплекса коррелирует с исчезновением GJCs [84]. Очень важным было также открытие того, что рост накопления в цитоплазме и/или в ядре β -катенина часто наблюдалось при наличии мутаций гена β -катенина при раке толстой кишки и шейки матки человека [85, 86]. Подобные мутации приводят к появлению более стабильной формы протеина, что может служить промотором процессов канцерогенеза [87].

Наши данные показали, что альтерации E-кадхерин/ β -катениновых комплексов часто встречаются в уротелии мочевого пузыря у больных I группы. Повышенные уровни протеинов β -катенина, и в меньшей мере E-кадхерина, ассоциированные с их накоплением в цитоплазме, обнаруживались в зонах уротелиальной дисплазии и рака *in situ*. Полученные данные подтвердили возможность участия E-кадхерин/ β -катениновых комплексов в канцерогенезе мочевого пузыря, индуцированном ИР. Они также показали, что высокие уровни протеинов и их аномальная внутриклеточная локализация являются ранними проявлениями начальных стадий канцерогенеза в мочевом пузыре, индуцированном долговременным действием малых доз ионизирующего излучения. Наши данные о том, что оксидативный стресс разрушает E-кадхерин/ β -катениновые комплексы в какой-то мере подтверждаются другими работами, показавшими, что оксидативный стресс вызывает перераспределение E-кадхерина из плазменной мембраны в цитоплазму [84, 88]. Последние работы также показали, что внутриклеточное накопление β -катенина соответствует повышению уровня гипофосфорилированного β -катенина вследствие мутации, в свою очередь ведущему к трансдукции онкогенных сигналов и опухолевой прогрессии [89]. Поэтому β -катенин в настоящее время рассматривается как потенциальный онкоген и его экспрессия может привести к преждевременному выходу клетки из клеточного цикла после γ -облучения

и повреждения ДНК и, таким образом, способствовать появлению мутаций онкогенов, приводящих, в свою очередь, к повреждению ДНК, индуцирующему блок клеточного цикла в фазе G1 [90].

Таким образом, наши данные позволяют сделать вывод о важной роли клеточных мембран и межклеточных соединений, ответственных за паракрин/аутокриную сигнализацию, которые являются важной мишенью при постоянном, долговременном действии малых доз ИР.

Литература

1. Trosko E.J. Radiation-induced carcinogenesis: Paradigm consideration // Biological effects of low level exposures: Dose – response relationships. – Lewis Publisher, 1994. – P. 205-241.
2. Tubiana M. The report of the French Academy of Science: “Problems associated with the effects of low doses of ionizing radiation“ //”J. radiol. Prot. – 1998. – V. 18. – P. 243-248.
3. Trosko E.J. Role of low-level ionizing radiation in multi-step carcinogenic process // Health Phys. – 1996. – V. 70. – P. 812-822.
4. Cardis E., Gilbert E.S., Carpenter L., Kato I., Armstrong B.K., Beval V., Cowper G., Douglas A. Effects of low doses and low dose rates of external ionizing radiation: cancer mortality among industry workers in three countries // Radiat. Res. – 1995. – V. 142. – P. 117-132.
5. Kroft S.H., Oyasu R. Biology of disease. Urinary bladder cancer: mechanisms of development and progression // Lab. Invest. – 1994. – V. 71. – P. 158-174.
6. Cohen S.M., Ellwein L.B. Cell proliferation in carcinogenesis // Science. – 1990. – V. 249. – P. 1007-1001.
7. Masui T., Don I., Takada N., Ogawa K., Shirai T., Fukushima S. p53 mutations in early neoplastic lesions of the urinary bladder in rats treated with N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine // Carcinogenesis. – 1994. – V. 15. – P. 2379-2381.
8. Simoneau A.R., Jones P.A. Bladder cancer: the molecular progression to invasive disease // World J. Urol. – 1994. – V. 12. – P. 89-95.1
9. Yamamoto S., Masui T., Murai T., Mori S., Oohara T., Makino S., Fukushima S., Tatematsu M. Frequent mutations of the p53 gene and infrequent H- and K-ras mutations in urinary bladder carcinomas of NOH/Shi mice treated with N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine // Carcinogenesis. – 1995. – V. 16. – P. 2363-2368.
10. Hashimoto Y., Asamoto M., Okamura T., Kohri K., Shirai T. Immunohistochemical demonstration of p53 protein nuclear accumulation in preneoplastic and neoplastic lesions of the human urinary bladder // J. Urol. Pathol. – 1996. – V. 5. – P. 21-27.
11. Renan M.J. Point mutations, deletions and radiation carcinogenesis // Radiat. Res. – 1992. – V. 131. – P. 227-228.
12. Kelman Z. PCNA: structure, functions and interactions // Oncogene. – 1997. – V. 14. – P. 629-640.
13. Jiang W., Kahn S.M., Zhou P., Zhang Y.I., Cacace A.M., Infante S.D., Santella R.M., Weinstein I.B. Overexpression of cyclin D1 in rat fibroblasts causes abnormalities in growth control, cell cycle progression and gene expression // Oncogene. – 1993. – V. 8. – P. 3447-3457.

14. Nishida N., Fukuda Y., Komeda T., Kita R., Sando T., Furukawa M. Amplification and overexpression of the cyclin D1 gene in aggressive human hepatocellular carcinoma // *Cancer Res.* – 1994. – V. 54. – P. 3107-3110.
15. Betticher D.C., Heighway J., Hasleton P.S., Altermatt H.J., Ryder W.D. Prognostic significance of CCND1 (cyclin D1) overexpression in primary resected non-small cell lung cancer // *Br. J. Cancer.* – 1996. – V. 73. – P. 294-300.
16. Gansauge S., Gansauge F., Ramadani M., Stobbe H., Rau B., Harada N., Beger H. Overexpression of cyclin D1 in human pancreatic carcinoma is associated with poor prognosis // *Cancer Res.* – 1997. – V. 57. – P. 1634-1637.
17. Nakagawa H., Wang T.C., Zukerberg L., Odze R., Togawa K., May G.H.W., Wilson J., Rustgi A.K. The targeting of the cyclin D1 oncogene by an Epstein Barr virus promoter in transgenic mice causes dysplasia in the tongue, esophagus and forestomach // *Oncogene.* – 1997. – V. 14. – P. 1185-1190.
18. Lee C. C.R., Yamamoto S., Morimura K., Wanibuchi H., Nishisaka S., Nakatani T., Wada S., Kishimoto T., Fukushima S. Significance of cyclin D1 overexpression in transitional cell carcinomas of the urinary bladder and its correlation with histopathologic features // *Cancer.* – 1997. – V. 79. – P. 780-789.
19. El-Deiry W.S., Tokino T., Waldman T., Oliner J.D., Velculesku V.E., Burrell M., Hill D.E., Healy E., Rees J.L., Hamilton R., Kinzler K.W., Vogelstein B. Topological control of p21^{WAF1/Cip1} expression in normal and neoplastic tissues // *Cancer Res.*, 1995. – V. 55. – P. 2910-2919.
20. Ladanyi M., Cha C., Lewis R. Mdm2 gene amplification in metastatic osteosarcoma // *Cancer Res.* – 1993. – V. 53. – P. 16-18.
21. Lerch F.S., Tokino T., Meltzer O. p53 mutation and mdm2 amplification in human soft tissue sarcomas // *Cancer Res.* – 1993. – V. 53. – P. 2231-2234.
22. Reifenberger G., Liu L., Ichimara K. Amplification and overexpression of the mdm2 gene in a subset of human malignant gliomas without p53 mutations // *Cancer Res.* – 1993. – V. 53. – P. 2736-2739.
23. Romanenko A., Morimura K., Wanibuchi H., Salim E., Kinoshita A., Kaneko M., Vozianov A., Fukushima S. Increased oxidative stress with gene alteration in urinary bladder urothelium after the Chernobyl accident // *Int. J. Cancer.* – 2000. – V. 86. – P. 790-798.
24. Romanenko A., Morimura K., Wei M., Zamarin W., Vozianov A., Fukushima S. DNA damage repair in bladder urothelium after the Chernobyl accident in Ukraine // *J. Urol.* – 2002. – V. 168. – P. 973-977.
25. Sidransky D., Von Eschenbach A., Tsai Y.C., Jones P., Summerhayes I., Marshall F., Paul M., Green P., Hamilton S.R., Frost P., Vogelstein B. Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples // *Science.* – 1991. – V. 252. – P. 706-709.
26. Fujimoto K., Yamada Y., Okajima E., Kakizoe T., Sasaki H., Sugimura T., Terada M. Frequent association of p53 gene mutation in invasive bladder cancer // *Cancer*

- Res. – 1992. – V. 52. – P. 1393-1398.
27. Spruck C.H., Ohneseit P.F., Gonzales Z.M., Esrig D., Miyao N., Tsai Y.C., Lerner S.P., Steven K., Horn T., Skinner D.G., Jones P.A. Two molecular pathways to transitional cell carcinoma of the bladder // *Cancer Res.* – 1994. – V. 54. – P. 784-788.
 28. Yamamoto S., Tatematsu M., Yamamoto M., Fukami H., Fukushima S. Clonal analysis of urothelium carcinomas in C3H/HeN-BALB/c chimeric mice treated with N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine // *Carcinogenesis.* – 1998. – V. 19. – P. 855-860.
 29. Di Leonardo A., Linke S.P., Clarkin K., Wahl G.M. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long term induction of C1P1 in normal human fibroblasts // *Genes Dev.* – 1994. – V. 8. – P. 2540-2551.
 30. Garbois D.M., Bradbury E.M., Lehnert B.E. Control of radiation-induced G1 arrest by cell-substratum interactions // *Cancer Res.* – 1997. – V. 57. – P. 1151-1156.
 31. Knuechel R., Burgan M., Rauschoff J., Hofstaedter F. Proliferating cell nuclear antigen in normal urothelium and urothelial lesions of the urinary bladder: a quantitative assessment using a true colour image analysis system // *Virchows Arch. B. Cell Pathol.* – 1993. – V. 64. – P. 137-144.
 32. Sorlie T., Martel-Planche G., Hainaut P., Lewalter J., Holm R., Borresen-Dale A.L., Montesano R. Analysis of p53, p16MTS, p21^{WAF1/Cip1} and H-ras in activated bladder tumors from workers exposed to aromatic amines // *Brit. J. Cancer* // 1998. – V. 77. – P. 1573-1579.
 33. Shibayama H., Anzai N., Braun S.E., Fukuda S., Mantel C., Broxmeyer H.E. H-ras is involved in the inside-out signaling pathway of interleukin-3-induced integrin activation // *Blood.* – 1999. – V. 93. – P. 1540-1548.
 34. Montersill C., Harney J., Cottell D., Parsons K., Muphy D.M., Seymour C.B. Primary explants of human uroepithelium show an unusual response to low-dose irradiation with cobalt-60 gamma rays // *Radiat. Res.* – 1995. – V. 142. – P. 181-187.
 35. Murata J., Tada M., Iggo R.D., Swamura Y., Abe H. Nitric oxide as a carcinogen: analysis by yeast functional assay of inactivating p53 mutations induced by nitric oxide // *Mutat. Res.* – 1997. – V. 379. – P. 211-218.
 36. Bolontrade M.F., Stern M.C., Binder R.L., Zenklusen J.C., Gimenez-Conti I.B., Conti C.J. Angiogenesis is an early event in the development of chemically induced skin tumors // *Carcinogenesis.* – 1998. – V. 19. – P. 2107-2113.
 37. Shin E.Y., Park M.K., Jeong G.B., Kim E.G., Kim S.Y. H-ras is a negative regulator of alpha 3 beta 1 integrin expression in ECV304 endothelial cells // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* – 1999. – V. 93. – P. 95-99.
 38. Ambs S., Bennett W.P., Merriam W.G., Ogunfusika M.O., Oser S.M., Jones R.T., Harris C.C. Vascular endothelial growth factor and nitric oxide synthase expression in human lung cancer and the relation to p53 // *Br. J. Cancer.* – 1998. – V. 78. – P. 233-239.

39. Wilson K.T., Fu S., Ramanujam K.S., Meltzer S.J. Increased expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in Barrett's esophagus and associated adenocarcinomas // *Cancer Res.* – 1998. – V. 58. – P. 2929-2934.
40. Nathan C., Xie Q.W. Nitric oxide synthases: roles, tools, and controls // *Cell.* – 1994. – V. 78. – P. 915-918.
41. Maeda H., Akaike T. Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer // *Biochemistry.* – 1998. – V. 63. – P. 854-865.
42. Fujimoto H., Sasaki J., Matsumoto M., Suga M., Ando Y., Iggo R., Tada M., Saya H., Ando M. Significant correlation of nitric oxide synthase activity and p53 gene mutation in stage I lung adenocarcinoma // *Jpn. J. Cancer Res.* – 1998. – V. 89. – P. 696-702.
43. Nakae D., Kobayashi Y., Akai H., Andoh N., Satoh H., Ohashi K., Tsutsumi M., Konishi Y. Involvement of 8-hydroxyguanine formation in the initiation of rat liver carcinogenesis by low dose levels of N-nitrosodiethylamine // *Cancer Res.* – 1997. – V. 57. – P. 1281-1287.
44. Buckman S.A., Gresham A., Hale P., Hruza G., Anast J., Masferrer J., Pentland A.P. COX2 expression is induced by UVB exposure in human skin : implications for the development of skin cancer // *Carcinogenesis.* – 1998. – V. 19. – P. 723-729.
45. Raes F., De Cort M., Graziani G. Multi-fractal nature of radioactivity deposition on soil after the Chernobyl accident // *Health Phys.* – 1991. – V. 61. – P. 271-282.
46. Romanenko A., Vozianov A., Mikuz G, Obrist P., Ensinger C., Busch C. Expression of p53 and mdm2 protein in bladder urothelium of patients living in the radiocontaminated areas of Ukraine // *J. Urol. Path.* – 1999. – V. 11, № 3. – P.47-58.
47. Irani K. Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival. A review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling // *Circ. Res.* – 2000. V. 87. – P. 179-183.
48. Wang X., Martindale I.L., Liu Y., Holbrook N.J. The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signaling pathways on cell survival // *Biochem. J.* – 1998. – V. 333. – P. 291-300.
49. Gupta A., Rosenberger S.F., Bowden G.T. Increased ROS levels contribute to elevated transcription factor and MAP kinase activities in malignantly progressed mouse keratinocyte cell lines // *Carcinogenesis.* – 1999. – V. 20. – P. 2066-2073.
50. van Hogerlinden M., Rozell B.L., Ahrlund-Richter L., Toftgard R. Squamous cell carcinomas and increased apoptosis in skin with inhibited nuclear factor kB signaling // *Cancer Res.* – 1999. – 59: 329-3303.
51. Huang S., De Guzman A., Bukana C.D., Fidler I.J. Nuclear factor-kB activity correlates with growth angiogenesis and metastasis of human melanoma cells in nude mice // *Clin. Cancer Res.* – 2000. – V. 6. – P. 2573-2581.
52. Prasad A.V., Mohan N., Chandrasekar B., Meltz M.L. Activation of Nuclear factor kB in human lymphoblastoid cells by low-dose ionizing radiation // *Radiation Res.* – 1994. – V. 138. – P. 367-372.

53. Taher M.M., Oakley J.D., Hershey C., Valerie K. Activation of NF-kB and p38 MAP kinase is not sufficient for triggering efficient HIV gene expression in response to stress // *Biochemistry*. – 2000. – V. 39. – P.1709-1715.
54. Cadet J., Berger M., Douki T., ravant J.I. Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biological significance // *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* – 1997. – V. 131. – P. 1-10.
55. Le Page F., Margot A., Grollman A.P., Sarasin A., Gentil A. Mutagenicity of a unique 8-oxoguanine in a human Ha-ras sequence in mammalian cells // *Carcinogenesis*. – 1995. – V. 16. – p. 2779-2785.
56. Friedberg E.S., Walker G.C., Siede W. DNA repair and mutagenesis. – Washington: D.C.:American Society for Microbiology Press, 1995. – 144 p.
57. Buchko G.W., Iakoucheva L.M., Kennedy M.A., Ackerman E.J., Hess N.J. Extended x-ray absorption fine structure evidence for a single metal binding domain in xenopus laevis nucleotide excision repair protein XPA // *Biochem. Biophys. Commun.* – 1999. – V. 254. – P. 109-114.
58. Klein J.C., Beems R.B., Hamzing M., Zomer G., van Steeg H. Intestinal toxicity and carcinogenesis potential of the food mutagen 2-amino-1-methyl-6 phenylimidazo [4,5-b] pyridine (PhIP) in DNA repair deficient XPA -/- mice // *Carcinogenesis*. – 2001. – V. 22. – P. 619-622.
59. Ramana C.V., Boldogh I., Izumi T., Mitra S. Activation of apurinic/aprimidinic endonuclease in human cells by reactive oxygen species and its correlation with their adaptive response to genotoxicity of free radicals // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1998. – V. 22. – P. 5061-5067.
60. Takao M., Aburanati H., Kobayashi K., Yasui A. Mitochondrial targeting of human DNA glycosylases for repair of oxidative DNA damage // *Nucleic Acids Res.* – 1998. – V. 26. – P. 2917-2919.
61. McCullough A.K., Dodson M.L., Lloyd R.S. Initiation of base excision repair: glycosylate mechanisms and structures // *Annu. Rev. Biochem.* – 1999. – V. 68. – P. 255-259.
62. Braithwaite E., Wu X., Wang Z. Repair of DNA lesions induced by polycyclic aromatic hydrocarbons in human cell-free extracts: involvement of two excision repair mechanisms in vitro // *Carcinogenesis*. – 1998. – V. 19. – P. 1239-1244.
63. Herring C.J., West C.M., Wilks D.P., Davidson S.E., Hunter R.D., Berry P. Levels of the DNA repair enzyme human apurinic/aprimidinic endonuclease (APE1, APEX, Ref1) are associated with the intrinsic radiosensitivity of cervical cancers // *Br. J. Cancer*. – 1998. – V. 78. – P. 1128-1132.
64. Cheo D.L., Meira L.B., Burns D.K., Reis A.M., Isaac T., Friedberg E.C. Ultraviolet B radiation-induced skin cancer in mice defective in Xpc, trp53 and Apex (HAP1) genes: genotype-specific effects on cancer predisposition and pathology of tumors // *Cancer Res.* – 2000. – V. 60. – P. 1580-1586.

65. Offer H., Zurer I., Banfalvi G., Reha'k M., Falcovitz A., Milyavsky M. p53 modulates base excision repair activity in a cell cycle-specific manner after genotoxic stress // *Cancer Res.* – 2001. – V. 61. – P. 88-92.
66. Li R.Y., Calsou P., Jones C.J., Salles B. Interactions of the transcription/DNA repair factor TFIIH and XP repair proteins with DNA lesions in a cell-free repair assay // *J. Mol. Biol.* – 1998. – V. 281. – P. 211-215.
67. Barcellos-Hoff M.N., Brooks A.L. Extracellular signaling through the microenvironment: a hypothesis relating carcinogenesis, bystander effect and genomic instability // *Radiat. Res.* – 2001. – V. 156. – P. 618-627.
68. Johnson C.J., Williams J.P., Okunieff P., Finkelstein J.N. Radiation-induced pulmonary fibrosis: examination of cytokine and chemokine receptor families // *Radiat. Res.* – 2002. – V. 157. – P. 256-265.
69. Week B.H., He W., Olson K.L., Wang X.J. Inducible expression of transforming growth factor β 1 in papilloma causes rapid metastasis // *Cancer Res.* – 2001. – V. 61. – P. 7435-7443.
70. Gold L.J., Jissila T., Fusenig N.E., Stenback F. TGF-beta isoforms are differentially expressed in increasing malignant grades of HaCaT keratinocytes, suggesting separate roles in skin carcinogenesis // *J. Pathol.* – 2000. – V. 190. – P. 579-588.
71. Prekh T.V., Gamma P., Wen X., Demopoulos R., Munger J.S., Carcangiu M.L., Reiss M., Gold L.J. Transforming growth factor beta signaling in disabled early in human endometrial carcinogenesis concomitant with loss of growth inhibition // *Cancer Res.* – 2002. – V. 62. – P. 2778-2790.
72. Iyer R., Lehnert B.E. Factors underlying the cell growth-related bystander responses to alpha-particles // *Cancer Res.* – 2000. – V. 60. – P. 1290-1298.
73. Eder I.E., Stenzl A., Hobish A., Cronauer M.V., Bartsh G., Klocker H. Expression of transforming growth factor beta 1, beta 2 and beta 3 in human bladder carcinomas // *Br. J. Cancer.* – 1997. – V. 75. – P. 1753-1760.
74. Parrish A.R., Catania J.M., Orozco J., Gandolfi A.J. Chemically induced oxidative stress disrupts the E-cadherin/catenin cell adhesion complex // *Toxicol. Scien.* – 1999. – V. 51. – P. 80-86.
75. Mialhe A., Louis J., Montlevier S., Pecho M., Pasquier D., Bosson J.L., Rambeaud J.J., Seigneurin D. Expression of E-cadherin and alpha-, beta- and gamma-catenins in human bladder carcinomas: are they good prognostic factors? // *Invasion Matastasis.* – 1997. – V. 17. – P. 124-137.
76. Moon R.T., Bowerman B., Boutros M., Perrimon N. The promise and perils of the Wnt signaling through beta-catenin // *Science.* – 2002. – V. 296. – P. 1644-1646.
77. Bindels E.M., Vermey M., De Both N.J., van der Kwast T.H. Influence of the microenvironment of invasiveness of human bladder carcinoma cell lines // *Virchows Arch.* – 2001. – V. 439. – P. 522-529.
78. Wall B.M., Dmochowski R.R., Malecha M., Mangold T., Bobal M.A., Cooke C.R. Inducible nitric oxide synthase in the bladder of spinal cord injured patients with chronic indwelling urinary catheter // *J. Urol.* – 2001. – V. 165. – P. 1457-1461.

79. Haddad J.J. Redox regulation of pro-inflammatory cytokines and I κ B-alpha/NF-kB nuclear translocation and activation // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2002. – V. 296. – P. 847-856.
80. Roedel F., Kley N., Beuscher H.U., Hildebrandt G., Keilholz L., Kern P., Voll R., Herrmann M., Sauer R. Anti-inflammatory effect of low-dose X-irradiation and the involvement of a TGF-beta 1-induced down-regulation of leukocyte/endothelial cell adhesion // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2002. – V. 78, № 8. – P. 711-718.
81. Ehrhart E.J., Segarini P., Tsang M.L., Carroll A.G., Barcellos-Hoff M.H. Latent transforming growth factor beta 1 activation in situ: quantitative and functional evidence after low-dose gamma-irradiation // *FASEB J.* – 1997. – V. 11. – P. 991-1002.
82. Sai K., Upham B.L., Kang K.S., Hasegawa R., Inoue T., Trosko J.E. Inhibitory effect of pentachlorophenol on gap junctional intercellular communication in rat liver epithelial cells in vitro // *Cancer Lett.* – 1998. – v. 130. – P. 9-17.
83. Jongen W.M., Fitzgerald D.J., Asamoto M., Piccoli C., Slaga T.J., Gros D., Takeichi M., Yamasaki H. Regulation of connexin 43-mediated gap junction intercellular communication by Ca²⁺ in mouse epidermal cells is controlled by E-cadherin // *J. Cell Biol.* – 1991. – V. 114. – P. 545-555.
84. Jansen L.A., Mensil M., Jongen W.M. Inhibition of gap junction intercellular communication and delocalization of the cell adhesion molecule E-cadherin by tumor promoters // *Carcinogenesis.* – 1996. – V. 17. – P. 1527-1531.
85. Morin P.J., Sparks A.B., Korinek V., Clevers H., Vogelstein B., Kinzler K.W. Activation of beta-catenin/Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC // *Science.* – 1997. – V. 275. – P. 1787-1790.
86. Pereira-Suarez A.L., Meraz M.A., Lizano M., Estrada-Chavez C., Hernandez F., Olivera P., Perez E., Padilla P., Yaniv M., Thierry F., Garcia-Carranca A. Frequent alterations of the beta-catenin protein in cancer of the uterine cervix // *Tumor Biol.* – 2002. – V. 23. – P. 45-53.
87. Peifer M. Beta catenin as oncogene: the smoking gun // *Science.* – 1997. – V. 275. – P. 1752-1753.
88. Schmelz M., Schmid V.J., Parrish A.R. Selective disruption of cadherin/catenin complex by oxidative stress in precision cut mouse liver slices // *Toxicol. Sciences.* – 2001. – V. 61. – P. 389-394.
89. Shiina H., Igawa M., Urakami S., Shigeno K., Yoneda T., Terashima M., Deguchi M., Ribeiro-Filho L., Dahiya R. Alterations of beta- and gamma-catenin in N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine-induced murine bladder cancer // *Cancer Res.* – 2001. – V. 61. – P. 7101-7109.
90. Orford K., Orford C.C., Byers S.W. Exogenous expression of beta-catenin regulates contact inhibition, anchorage-independent growth, anoikis and radiation-induced cell cycle arrest // *J. Cell Biol.* – 1999. – V. 146. – P. 855-868.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По своим радиоэкологическим и дозиметрическим последствиям авария на ЧАЭС обладает рядом специфических характеристик, которые делают ее уникальной, в сравнении с другими крупными радиационными авариями. Мир впервые столкнулся с аварийным выбросом, который по весьма сложному сценарию продолжался в течение не менее двух недель. Во всех других всемирно известных авариях и радиационных катастрофах имел место залповый выброс. Кроме того, пролонгированный выброс проходил в условиях меняющейся аэрометеорологической обстановки и при высокой температуре истекающих из кратера разрушенного блока материалов. Это привело к резкому усложнению временных распределений радиоактивных облаков, траекторий их перемещения, существенных межрадионуклидных сепараций, что, в конечном счете, обусловило крайнюю гетерогенность (“мозаичность”) образовавшихся вследствие чернобыльских выпадений радиоактивных пятен [1].

Радиоактивное загрязнение территорий оказалось связанным с чрезвычайно разнообразными ландшафтно-почвенными условиями. Значения агрегированного трансфер-фактора, определяющего переход цезия из почвы в молоко, для территорий Украины оказались лежащими в диапазоне от 0,1 до 30. Между тем во всем мире этот диапазон смещен в область малых значений от 0,01 до 0,5. Следовательно, Чернобыльская авария именно в Украине создала значительные зоны с крайне высоким радиационным риском производства загрязненной мясо-молочной продукции.

И, наконец, Чернобыльская авария сформировала, с одной стороны, очень сложный по физическим и пространственно-временным характеристикам источник излучения, а с другой – беспрецедентное по своим масштабам и структуре облучение разных контингентов населения. Это и около 100 тыс. эвакуированных из 30-километровой зоны, и сотни тысяч ликвидаторов, и миллионы лиц, проживающих на территориях, интенсивно загрязненных чернобыльскими выпадениями. Особой группой, реально пострадавшей вследствие Чернобыльской катастрофы следует считать сотни тысяч детей, получивших значительный дозовый удар по щитовидной железе.

Именно из-за Чернобыльской катастрофы, мировая медицинская радиобиология впервые столкнулась с проблемой долговременного (многолетнего) хронического действия малых доз ионизирующей радиации на организм человека в условиях его постоянного проживания в загрязненных долгоживущими радионуклидами регионах Украины.

Поистине огромную работу по изучению радиологической обстановки и доз облучения населения Украины после аварии на ЧАЭС проделала большая группа сотрудников Научного центра радиационной медицины АМН Украины под руководством его фундатора и на протяжении многих лет директора, академика АМН Украины А.Е. Романенко и зав. отделом профессора И.А. Лихтарева. Именно этому коллективу ученых мы обязаны объективной оценке всех последствий и выявлению перечисленных выше особенностей Чернобыльской аварии для Украины.

Публикации в прессе о медико-социальных последствиях аварии на ЧАЭС, а также о ее медико-биологическом значении с попыткой прогнозирования состояния здоровья пострадавшего населения, насчитывают более 5300 источников в период с 1986 по 2000 гг. При этом зачастую публикуемые материалы носят противоречивый характер. Возможно, это происходит потому, что авария на ЧАЭС – самая крупная в мире и человечество еще не сталкивалось с проблемами ликвидации последствий такой гигантской катастрофы. Основная масса опубликованных научных работ отражает действие высоких доз радиации. Что же касается изучения биологического действия малых или низких доз и уровней облучения, то до настоящего времени в мировой литературе относительно последствий Чернобыльской аварии такие исследования встречаются крайне редко, а их данные нередко остаются дискуссионными.

Так, например, А.М. Кузин (1991) и Е.Б. Бурлакова (1994) опубликовали работы о стимулирующем действии малых доз радиации. Я.И. Серкиз (1989) указывает на риск проявления отрицательных отдаленных последствий радиации в области малых доз. Л.А. Бурлаков (1991) утверждает, что нет связи между дозой и заболеваемостью в случае, если уровень дозы меньше 100 сЗв. Малые дозы ионизирующей радиации, как считают некоторые исследователи, не вызывают повреждений или даже, напротив, оказывают стимулирующее действие (гормезис), либо влияют на адаптацию, способствуя приспособлению

организмов к новым метастабильным условиям существования без проявления ранних изменений или отдаленных последствий.

В 1990 г. впервые были описаны два родственных феномена, которые заставили по-новому относиться к малым дозам ионизирующей радиации, это индуцированная радиацией геномная нестабильность ИРГН и так называемый “байстэндер эффект” (“bystander effect”). Первый феномен заключается в том, что вызванные радиацией (как правило, низкими дозами) эффекты могут возникать *de novo* через несколько генераций после первичного радиационного повреждения. Это впервые было доказано в 1992 г. Kadhim E. A., выявившего неклональные аберрации в культуре клеток костного мозга после воздействия 0,5 или 2 α -частицами через несколько генераций выживших после облучения клеток. Индуцированная радиацией геномная нестабильность включает в себя и такие явления, как отдаленные летальные мутации, отдаленный апоптоз, неклональные аберрации, повышение мутагенности и генерация мелких ядер [2].

При воздействии малых доз ИР были описаны повреждения необлученных клеток, то есть клеток, соседствующих с облученными, этот феномен получил название “байстэндер эффекта”. В его основе лежат те молекулярные повреждения, которые возникают и передаются путем межклеточных контактов через паракрин/аутокринсигнальные процессы (при участии простагландинов, простациклинов, тромбоксанов и т.д.) [3]. Оба упомянутые феномена современные авторы единодушно связывают с радиационным канцерогенезом.

Проведенные нами исследования удаленных опухолей почек с прилежащей к опухоли почечной тканью, а также уротелия мочевого пузыря у лиц, проживающих в загрязненных радионуклидами регионах Украины, впервые выявили неизученные до настоящего времени патологические изменения, которые могли возникнуть вследствие хронического, постоянного и регулярного действия малых доз ИР (на протяжении 17 лет). Наши радиометрические исследования подтвердили значительное повышение уровня ^{137}Cs в моче у больных, проживающих на загрязненных радионуклидами территориях Украины. При анализе больных с доброкачественной гиперплазией предстательной железы, у которых обычно отмечается затруднение оттока и, соответственно – повышенный уровень остаточной мочи, можно предположить пролонгированную экспозицию ^{137}Cs на уротелий мочевого

пузыря. Нельзя забывать, однако, что Украина относится к экологически неблагоприятным странам. Экономические и социальные структуры в ней все еще бедны, и население Украины, особенно его значительная часть в виде сельского населения, да и частично городского, продолжает употреблять в качестве пищи плоды со своих огородов (без экологического контроля). Таким образом, изученные нами больные (большинство из которых, кроме того, курят более 20 лет), проживая на загрязненных радионуклидами территориях, могут синергически подвергаться воздействию совокупности различных вредных факторов. Ведущая роль при этом принадлежит Чернобыльской катастрофе, включая эффект долгоживущего ^{137}Cs , а также, возможно, и других радионуклидов, которых мы радиометрически не изучали. Чернобыльскую катастрофу, таким образом, следует рассматривать, как важный компонент комплексного синергического эффекта для развития выявленной и впервые описанной нами “радиационной склерозирующей пролиферативной атипической нефропатии” в почке (РСПАН), а в мочевом пузыре – “чернобыльского цистита”. Доказательством этого положения служит и факт отсутствия указанных патологических изменений у аналогичных больных, проживающих в “чистых” (свободных от радионуклидов) регионах Украины, а также у таких же больных, проживающих в Швеции, Австрии и Испании [4, 5].

В молекулярном патогенезе РСПАН, выявляемой в перитуморальной ткани и часто сочетающейся с повышением распространенности тубулярной эпителиальной ядерной атипии и рака *in situ* у больных ПКР, проживающих в загрязненных радионуклидами регионах Украины, ведущее значение, как показали наши исследования, имеет оксидативный стресс, активирующий p38MAPK каскад, который в свою очередь приводит к инактивации INK4A/ARF локуса хромосомы 9p21 и p15^{INK4B}. При этом наиболее характерным было преобладание aberrантной гиперметилиации генов p14^{ARF} и p16^{INK4A} в сочетании с потерей иммуногистохимически определяемой экспрессии протеинов p16^{INK4A} и p14^{ARF}, что подтверждает значение нарушений в регуляции фазы G1/S клеточного цикла на ранних стадиях канцерогенеза при почечноклеточном раке, равно как и при опухолевой прогрессии под длительным, хроническим воздействием малых доз ионизирующего излучения [6, 7].

Сравнительная характеристика почечноклеточного рака в Украине и в Испании также показала, что ПКР украинских больных, проживающих в загрязненных радионуклидами регионах страны, отличаются от аналогичных опухолей в г. Валенсии более высокой степенью ядерной атипии, более высоким процентом саркоматоидных изменений при конвенционном раке и слабой перитуморальной воспалительной реакцией. При этом опухоли ПКР украинских больных из радиоактивно загрязненных зон отличались высокой агрессивностью в своем биологическом поведении и повышенной пролиферативной активностью, что проявлялось значительной экспрессией PCNA и K-ras [5].

Комплекс гистологических, иммуногистохимических и молекулярно-генетических исследований слизистой оболочки мочевого пузыря у мужчин с доброкачественной гиперплазией предстательной железы и женщин с хроническим циститом, проживающих в загрязненных радионуклидами регионах Украины, позволил выявить новое, ранее никем не описанное патологическое состояние мочевого пузыря, соответствующее радиационному хроническому пролиферативному атипическому циститу, или “чернобыльскому циститу”. Такие изменения характеризовались множественными очагами дисплазии уротелия и CIS в сочетании со склерозом и гиалинозом соединительной ткани, активным ангиогенезом, со слабовыраженной воспалительной инфильтрацией lamina propria и, как упоминалось выше, явились следствием долговременного, хронического действия малых доз ионизирующего излучения.

За последние годы биологический эффект хронически действующих малых доз ИР, его взаимосвязь с хроническим воспалением и канцерогенезом привлекает все больше внимания [8].

Хорошо известно, что хроническое воспаление, как, например, гастриты и гепатиты, которые вызываются хронической инфекцией, а также могут быть индуцированы различными физическими агентами (курение, асбестоз) и инфекционными реакциями неясной этиологии (как язвенный колит, панкреатит и др.) являются факторами риска в развитии рака у человека. Начиная с 60-х годов прошлого столетия, помимо хронической бактериальной инфекции, в развитии рака важную роль стали уделять химическим канцерогенам, физическим агентам,

таким, как ионизирующая радиация, и вирусам (HBV, HCV, papilloma viruses и др.). По мнению многих авторов, хроническое действие перечисленных факторов также приводит вначале к развитию хронического воспаления [9].

В тканях с выраженным воспалением выявляются разнообразные воспалительные клетки, в том числе нейтрофилы, базофилы, эозинофилы, макрофаги и лимфоциты, которые активируются для продукции потенциальных оксидантов с целью поражения и разрушения микроорганизмов и инородных тел. Однако, если инфекция не развивается быстро, либо контроль иммунного ответа плохо регулируется, воспаление становится хроническим и вызывает существенные повреждения тканей, благодаря продолжительной продукции активных протеолитических энзимов и потенциальных оксидантов, включая анионы супероксида (O_2^-), оксид азота (NO), анион нитроксила ($NO\cdot$), перекись водорода (H_2O_2) и индуцибельную изоформу NO синтазы (iNOS). Перечисленные свободные радикалы и оксиданты реагируют друг с другом, чтобы генерировать новые реактивные кислородные и азотистые частицы, такие, как анионы пероксинитрита ($ONOO^-$) и нитрил хлорид (NO_2Cl). Они не только повреждают ДНК, вызывая мутации, но и участвуют на ранних стадиях канцерогенеза, активируя продукты онкогенов и/или инактивируя протеины, супрессирующие опухолевый рост. Таким образом, воспаление способствует процессам инициации, росту и прогрессии нормальных клеток с последующей их трансформацией в злокачественные клетки [10].

Наши исследования показали значительное повышение экспрессии iNOS в сочетании с хроническим воспалением в слизистой оболочке мочевого пузыря у лиц, проживающих в радиационно загрязненных регионах Украины, что уже само по себе могло быть мутагенным через NO-зависимое повреждение ДНК и в сочетании с нарушениями репарации ДНК является потенциально канцерогенным [11].

Важно еще раз напомнить, что в диапазоне 0,1-1 Гр ионизирующая радиация не характеризуется “доза-эффект” отношениями, что подтверждает возможность возникновения нестабильного фенотипа в результате воздействия очень низких доз ИР [12].

ROS (реактивные частицы кислорода), продуцируемые ИР, имеют важное значение в патогенезе радиационного рака [13] как причина,

длительное время вызывающая специфические молекулярные изменения, которые ведут к активации или инактивации транскрипционных факторов, повреждающих экспрессию генов. Основным в действии ИР является генотоксичность, перекисное окисление липидов, активация активатора протеина 1 или NK-kB и генерация p53 или повреждение генов семейства gas [14, 15].

Наши исследования выявили частые и специфические мутации гена p53, преимущественно в виде G:C на A:T перемещений в CpG динуклеотидах уротелия мочевого пузыря в условиях оксидативного стресса, вызванного ионизирующей радиацией [16, 17]. Кроме того, указанные изменения могли способствовать селективной активации p38MAPK каскада и аресту клеточного цикла без апоптоза [18].

Выявленная нами высокая экспрессия p38MAPK, p65 и p50 субъединиц NK-kB в одних и тех же клетках уротелия подтверждает наличие оксидативного стресса, развивающегося в мочевом пузыре у больных, длительное время подвергшихся воздействию малых доз ИР. Интересным представляется тот факт, что радиация, вызванная ¹³⁷Cs, является, как известно, причиной дозозависимого повышения мутаций у MN *mutine* tumor клеточной линии и разрывов цепей ДНК в связи с генерацией гидроксильных радикалов [19, 20].

На основании полученных нами данных о высокой цитоплазматической экспрессии COX2 и iNOS в уротелии больных из загрязненных ¹³⁷Cs регионов Украины в сочетании с высокой экспрессией p38MAPK, p65 и p50 можно предположить, что длительное хроническое воздействие малых доз ИР приводит к молекулярным изменениям, развивающимся по двум направлениям:

1. Цитоплазматическое накопление NF-kB с его основными p65 и p50 субъединицами как результат синтеза протеина с последующей транслокацией в ядра уротелия.

2. p38MAPK-зависимая трансактивация NF-kB.

Оба эти молекулярные пути необходимы для полной активации NF-kB-зависимой транскрипции [21], что отражает наиболее ранние молекулярные события в уротелии под действием малых доз ИР.

Интересным представляется отмеченная нами выраженная активация ангиогенеза в lamina propria слизистой оболочки мочевого пузыря во всех наблюдениях с хроническим радиационным циститом

из загрязненных радионуклидами зон, с резким повышением p38 и p65 цитоплазматической и ядерной экспрессией в эндотелиальных клетках. Этот факт подтверждает важную роль p38MAPK каскада и p65 субъединицы NF- κ B в активации эндотелиальных клеток – как одного из компонентов, участвующих в патогенезе “чернобыльского цистита”.

Следует подчеркнуть, что классические описания острого и хронического радиационного эффектов в мочевом пузыре не имеют ничего общего с патогенезом повреждений в мочевом пузыре при длительном (более 17 лет) хроническом действии малых доз ИР. Мы не наблюдали у наших пациентов реактивной эпителиальной пролиферации в сочетании с отложениями фибрина, фибриноидного некроза сосудистых стенок, появления мелкодерных стромальных клеток – типичных патологических изменений, вызываемых высокими дозами ИР [22].

Выявленные нами ранние молекулярные изменения в уротелии, характерные для развития “чернобыльского цистита”, являющегося пренеопластическим состоянием у человека, а также молекулярно-генетические изменения в почке и почечноклеточном раке при опухолевой прогрессии в условиях хронического действия малых доз ионизирующей радиации позволяют расширить существующие представления о радиационном канцерогенезе в мочевом пузыре и почке, а также открывают новые возможности для поиска адекватных профилактических и терапевтических средств.

Академик АМН Украины А.М. Романенко.

Литература

1. Лихтарев И.А., Ковган Л.Н. Радиологическая обстановка и дозы облучения населения Украины после аварии на ЧАЭС // Медицинские последствия аварии на Чернобыльской атомной станции. – К.: «МЕДЭКОЛ» МНИЦ БИО-ЭКОС, 1999. – С. 5-65.
2. Morgan W.F., Kaplan M.I., McGhee E.M., Limoli C.L. Genomic instability induced by ionizing radiation // *Radiat. Res.* – 1996. – V. 146. – P. 247-258.
3. Ballarini F., Biaggi M., Ottolenghi A., Sapora O. Cellular communication and bystander effects: a critical review for modeling low-dose radiation action // *Mutation Res.* – 2002. – V. 501. – P. 1-12.
4. Romanenko A., Lee C.C.R., Yamamoto S., Hori T., Wanibuchi H., Zaporin W., Vinnichenko W., Voizianov A., Fukushima S. Urinary bladder lesions after the Chernobyl accident: immunohistochemical assessment of p53, proliferating cell nuclear antigen, cyclin D1 and p21^{WAF1/Cip1} // *Jpn. J. Cancer Res.* – 1999. – V. 90. – P. 144-153.
5. Romanenko A., Morell-Quadreny L., Nepomnyaschy V., Voizianov A., Llombart-Bosch A. sclerosis proliferative atypical nephropathy of peritumoral tissue of renal cell carcinomas after the Chernobyl accident in Ukraine // *Virchows Arch.* – 2001. – V. 438. – P. 146-153.
6. Romanenko A., Morimura K., Wei M., Zaporin W., Voizianov A., Fukushima S. DNA damage repair in bladder urothelium after the Chernobyl accident in Ukraine // *J. Urol.* – 2002. – V. 168. – P. 973-977.
7. Romanenko A., Morimura K., Wanibuchi H., Wei M., Zaporin W., Vinnichenko W., Kinoshita A., Voizianov A., Fukushima S. Urinary bladder lesions induced by persistent chronic low-dose ionizing radiation // *Cancer Sci.* – 2003. – V. 94. – P. 328-333.
8. Clarke R.H. Control of low-level radiation exposure: what is the problem and how can it be solved? // *Health Phys.* – 2001. – V. 80. – P. 391-396.
9. Aoki K. Chronic inflammation and cancer // UICC Symposium «Asian Cancer prevention – today and tomorrow». The first APOCP Conference «Inflammation and Cancer». – Aichi cancer Center, Nagoya, Japan. – 2002. – P. 23.
10. Ohshima H. Inflammation and carcinogenesis // UICC Symposium «Asian Cancer prevention – today and tomorrow». The first APOCP Conference «Inflammation and Cancer». – Aichi cancer Center, Nagoya, Japan. – 2002. – P. 26.
11. Lala P.K., Chakraborty C. Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumor progression // *Lancet Oncol.* – 2001. – V. 2. – P. 149-156.
12. Little J.B. Induction of genetic instability by ionizing radiation // *Acad. Sci. Paris Sciences de vie.* – 1999. – V. 322. – P. 127-134.

13. Trosko J.E. Radiation-induced carcinogenesis: Paradigm considerations // Biological effects of low level exposures: Dose-response relationships. – Bosa Raton, FL: Lewis Publishers, 1994. – P. 205-241.
14. Irani K. Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival. A review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling // *Circ. Res.* – 2000. V. 87. – P. 179-183.
15. Ding M., Shi X., Castranova V., Vallyathan V. Predisposing factors in occupational lung cancer: inorganic minerals and chromium // *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* – 2000. – V. 19. – P. 129-138.
16. Romanenko A., Morimura K., Wanibuchi H., Salim E., Kinoshita A., Kaneko M., Vozianov A., Fukushima S. Increased oxidative stress with gene alteration in urinary bladder urothelium after the Chernobyl accident // *Int. J. Cancer.* – 2000. – V. 86. – P. 790-798.
17. Yamamoto S., Romanenko A., Wei M., Masuda C., Zaparin W., Vinnichenko W., Vozianov A., Lee C.C., Morimura K., Wanibuchi H., Tada M., Fukushima S. Specific p53 gene mutations in urinary bladder epithelium after the Chernobyl accident // *Cancer Res.* – 1999. – V. 59. – P. 3606-3609.
18. Kurata S. selective activation of p38 MAPK cascade and mitotic arrest caused by low level oxidative stress // *J. Biol. Chem.* – 2000. – V. 275. – P. 23413-23416.
19. Ibuki Y., Goto R. Enhancement of NO production from resident peritoneal macrophages by in vitro gamma-irradiation and its relationship to reactive oxygen intermediates // *Free Radic. Biol. Med.* – 1997. – V. 22. – P. 1029-1035.
20. Sandhu J.K., Birnboim H.C. Mutagenicity and cytotoxicity of reactive oxygen and nitrogen species in the MN-11 murine tumor cell line // *Mutat. Res.* – 1997. – V. 379. – P. 241-252.
21. Taher M.M., Oakley J.D., Hershey C., Valerie K. Activation of NF- κ B and p38 MAP kinase is not sufficient for triggering efficient HIV gene expression in response to stress // *Biochemistry.* – 2000. – V. 39. – P.1709-1715.
22. Mostofi F.K., Davis C.J., Sesterhenn I.A. Histological typing of urinary bladder tumors // WHO International Histological Classification of Tumors. – Berlin: Springer-Verlag. – 1999. – P. 1-99.

УРОПАТОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ХРОНИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ МАЛЫХ ДОЗ РАДИАЦИИ ПОСЛЕ АВАРИИ НА ЧАЭС

Под редакцией **ВОЗИАНОВА А.Ф.** и **РОМАНЕНКО А.М.**

Литературный редактор
Технический редактор
Корректор
Оформление обложки
Компьютерная верстка

*Ольга Котульская
Светлана Демчишин
Людмила Данилевич
Павел Кушик
Светлана Левченко*

Подписано к печати 21.10.03. Формат 60x84/16.
Бумага офсетная №1. Гарнитура Times.
Печать офсетная. Усл. печ. лист. 8,6. Учет.-изд. лист. 8,25.
Тираж 1000. Зак. № 166.

Оригинал-макет подготовлен в отделе компьютерной верстки
издательства “Укрмедкнига”
Тернопольской государственной медицинской академии им. И.Я. Горбачевского.
Майдан Воли, 1, г. Тернополь, 46001, Украина.

Напечатано в типографии издательства “Укрмедкнига”
Тернопольской государственной медицинской академии им. И.Я. Горбачевского.
Майдан Воли, 1, г. Тернополь, 46001, Украина.

Свидетельство о внесении в государственный реестр
субъектов издательского дела ДК № 348 от 02.03.2001 г.