

Abstract

A. V. Rieznik,

R. A. Moskalenko,

A. M. Romanjuk,

*Sumy State University, 2 Rymko-
go-Korsakova str, Sumy, Ukraine,
40007*

**IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF PAPILLARY
THYROID CARCINOMA WITH BIOMINERALIZATION**

Resume. Thyroid cancer (TC) is the most frequent malignant tumor of the endocrine system, which besides has a relatively indolent course. The increasing incidence of thyroid cancer is mainly due to papillary thyroid cancer (PTC).

The **aim** is immunohistochemical studies of tissue of papillary thyroid cancer in conditions of presence and absence of biomineralization phenomena.

Materials and methods. 30 samples of PTC with signs of biomineralization and 30 samples without PTC biomineralization were examined. All PTC patients with signs of pathological biomineralization were joined in I (first) group (30 people). Patients who had PTC without signs of mineralization were included to the II (second) group (30 people). Immunohistochemical studies of protein expression of Ki-67, p53, bax, bcl-2, osteopontin (OPN), matrix metalloproteinase 1 (MMP1), and vascular endothelial growth factor (VEGF) were conducted in PTC tissue of both groups.

Data processing was carried out with the help of applied statistical methods, using Microsoft Excel 2010 with the addition AtteStat 12.0.5. The research results were checked for normal distribution by Shapiro-Wilky test. Evaluation of statistical significance of results difference between groups of samples was performed using nonparametric Mann-Whitney test and parametric t-Student test. The results were considered statistically significant at the probability of 95 % ($p < 0.05$).

Results. The difference between the results of immunohistochemical studies of bax expression ($p < 0.001$), OPN ($p < 0.001$) and VEGF ($p < 0.05$) in groups of PTC samples with the presence and absence of biomineralization may indicate their participation in pathological biomineralization processes under the conditions of this pathology.

It was found out that the presence of biomineralization is combined with significantly higher levels of expression of bax in thyroid tissue of malignant tumor ($p < 0.001$). High expression of bax protein and low expression of its antagonist bcl-2 indicate the strengthening of apoptosis in tumor cells.

The presence of pathological biomineralization leads to significantly higher levels of expression of protein OPN ($p < 0.001$) in the PTC tissue. It is known that osteopontin is an acidic phosphoprotein that is expressed in mineralized tissues and inhibits hydroxyapatite formation by binding to the surface of the crystals. We can assume that hyperproduction of osteopontin in tumor cells is a factor counteracting PTC biomineralization.

There have been exceeded endothelial growth factor expression in the group of PTC samples with calcification in comparison with PTC group without it ($p < 0.05$). Since VEGF protein is responsible for

restoring oxygen to tissues in the situation of insufficient blood circulation, it may indicate a higher level of hypoxia in the mineralized PTC tissues.

In general, assessing the impact of biomineralization on the course of PTC it can be said about its promotion to protective forces of the body, which is to enhance apoptosis in the tumor and to limit the spread and growth of tumors mechanically.

Keywords: thyroid cancer, biomineralization, immunohistochemistry, markers, apoptosis, osteopontin.

Corresponding author: r.moskalenko@med.sumdu.edu.ua

Резюме

А. В. Резнік,

Р. А. Москаленко,

А. М. Романюк,

Сумський державний університет, вул. Римського-Корсакова, 2, м. Суми, Україна, 40007

ІМУНОГІСТОХІМІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ПАПІЛЯРНОГО РАКУ ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ З БІОМІНЕРАЛІЗАЦІЄЮ

Рак щитоподібної залози (РЩЗ) є найбільш частою злоякісною пухлиною ендокринної системи, що має відносно сприятливий перебіг. Зростання кількості випадків РЩЗ відбувається в основному за рахунок папілярного раку щитоподібної залози (ПРЩЗ).

Метою роботи є імуногістохімічне дослідження тканини папілярного раку щитоподібної залози за умов наявності та відсутності явищ біомінералізації.

Матеріали та методи. Дослідили 30 зразків ПРЩЗ з ознаками біомінералізації та 30 зразків ПРЩЗ без біомінералізації. Усіх пацієнтів із ПРЩЗ, у яких виявлені ознаки патологічної біомінералізації, об'єднали в I групу (30 осіб). До II групи (30 осіб) увійшли хворі, які мали ПРЩЗ без ознак мінералізації. У тканині ПРЩЗ обох груп було проведено імуногістохімічне дослідження експресії білків Ki-67, p53, *bax*, *bcl-2*, остеопонтину (OPN), матричної металопротеїнази 1 (MMP1), судинного фактора росту ендотелію (VEGF). Обробку даних проводили прикладними статистичними методами за допомогою програми Microsoft Excel 2010 з додатком AtteStat 12.0.5. Результати досліджень були перевірені на нормальний розподіл за критерієм Шапіро – Уїлка. Оцінювання статистичної достовірності різниці результатів між групами зразків проводили за допомогою непараметричного критерію Манна – Уїтні та параметричного t-критерію Стьюдента. Результати вважали статистично достовірними при ступені вірогідності більше 95 % ($p < 0,05$).

Результати дослідження. Різниця між результатами імуногістохімічного дослідження експресії *bax* ($p < 0,001$), OPN ($p < 0,001$) та VEGF ($p < 0,05$) у групах зразків ПРЩЗ з наявністю та відсутністю біомінералізації може свідчити про їх участь у процесах патологічної біомінералізації за умов даної патології.

Було встановлено, що наявність біомінералізації поєднується з достовірно вищим рівнем експресії *bax* у тканині злоякісної пухлини ЩЗ ($p < 0,001$). Висока експресія білка *bax* та низька експресія його антагоніста *bcl-2* свідчать про посилення апоптозу у пухлинних клітинах.

Наявність патологічної біомінералізації призводить до достовірно вищих рівнів експресії білка OPN ($p < 0,001$) у тканині ПРЩЗ. Відомо, що остеопонтин є кислим фосфопротеїном, який експресується у мінералізованих тканинах і інгібує утворення гідроксіапатиту, зв'язуючись із поверхнею кристалів. Можна припустити, що гіперпроду-



кція остеопонтину пухлинними клітинами є фактором протидії біомінералізації ПРЩЗ.

Також було перевищення експресії фактора росту ендотелію у групі зразків ПРЩЗ із кальцифікацією над групою ПРЩЗ без кальцифікації ($p < 0,05$). Оскільки білок VEGF відповідає за відновлення подачі кисню до тканин у ситуації, коли циркуляція крові недостатня, це може свідчити про більш високий рівень гіпоксії у мінералізованих тканинах ПРЩЗ.

Загалом, оцінюючи вплив біомінералізації на перебіг ПРЩЗ, можна говорити про її сприяння захисним силам організму, яке полягає в посиленні апоптозу в пухлині, механічному обмеженні поширення та росту пухлини.

Ключові слова: папілярний рак щитоподібної залози, біомінералізація, імуногістохімія, маркери, апоптоз, остеопонтин.

Резюме

А. В. Резнік,
Р. А. Москаленко,
А. Н. Романюк,

Сумський державний університет, ул. Римського-Корсакова, 2, г. Суми, Україна, 40007

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПАПИЛЛЯРНОГО РАКА ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С БИОМИНЕРАЛИЗАЦИЕЙ

Рак щитовидной железы (РЩЖ) является наиболее частой злокачественной опухолью эндокринной системы, при этом имеет относительно благоприятное течение. Рост количества случаев РЩЖ происходит в основном за счет папиллярного рака щитовидной железы (ПРЩЖ).

Целью работы является иммуногистохимическое исследование ткани папиллярного рака щитовидной железы в условиях наличия и отсутствия явлений биоминерализации.

Материалы и методы. Исследовали 30 образцов ПРЩЖ с признаками биоминерализации и 30 образцов ПРЩЖ без биоминерализации. Всех пациентов с ПРЩЖ, у которых обнаружены признаки патологической биоминерализации, объединили в I группу (30 человек). Во II группу (30 человек) вошли больные, имеющие ПРЩЖ без признаков минерализации. В ткани ПРЩЖ обеих групп было проведено иммуногистохимическое исследование экспрессии белков Ki-67, p53, bax, bcl-2, остеопонтин (OPN), матриксной металлопротеиназы 1 (MMP1), сосудистого фактора роста эндотелия (VEGF).

Обработка данных проводилась прикладными статистическими методами с помощью программы Microsoft Excel 2010 с приложением AtteStat 12.0.5. Результаты исследований были проверены на нормальное распределение по критерию Шапиро – Уилки. Оценку статистической достоверности разницы результатов между группами образцов проводили с помощью непараметрического критерия Манна – Уитни и параметрического t-критерия Стьюдента. Результаты считали статистически достоверными при степени достоверности более 95 % ($p < 0,05$).

Результаты исследования. Было установлено, что наличие биоминерализации сочетается с достоверно более высоким уровнем экспрессии bax в ткани злокачественной опухоли щитовидной железы ($p < 0,001$). Высокая экспрессия белка bax и низкая экспрессия его антагониста bcl-2 свидетельствуют об усилении апоптоза в опухолевых клетках.

Присутствие патологической биоминерализации приводит к достоверно более высоким уровням экспрессии белка OPN ($p < 0,001$) в



ткани ПРЩЖ. Известно, что остеопонтин является кислым фосфопропротеином, который экспрессируется в минерализованных тканях и ингибирует образование гидроксиапатита, связываясь с поверхностью кристаллов. Можно предположить, что гиперпродукция остеопонтина опухолевыми клетками является фактором противодействия биоминерализации ПРЩЖ.

Также было выявлено превышение экспрессии фактора роста эндотелия в группе образцов ПРЩЖ с кальцификацией над группой ПРЩЖ без кальцификации ($p < 0,05$). Так как белок VEGF отвечает за восстановление подачи кислорода к тканям в ситуации, когда циркуляция крови недостаточна, это может свидетельствовать о более высоком уровне гипоксии в минерализованных тканях ПРЩЖ.

В общем, оценивая влияние биоминерализации на ход ПРЩЖ, можно сказать о ее содействии защитным силам организма, которое заключается в усилении апоптоза в опухоли, механическом ограничении распространения и роста опухоли.

Ключевые слова: рак щитовидной железы, биоминерализация, иммуногистохимия, маркеры, апоптоз, остеопонтин.

Автор, відповідальний за листування: r.moskalenko@med.sumdu.edu.ua

Вступ

Рак щитоподібної залози (РЩЗ) є найбільш частою злоякісною пухлиною ендокринної системи, що має відносно сприятливий перебіг [1, 2]. Зростання кількості випадків РЩЗ відбувається в основному за рахунок папілярного раку щитоподібної залози (ПРЩЗ) [3]. Така ситуація розвивається в усьому світі, зокрема в Україні та Сумській області [1, 4]. Так, за останні роки рівень захворюваності на РЩЗ в Сумській області вийшов на перші позиції в Україні, підвищуючи рівень загальнодержавного показника. Показники захворюваності на РЩЗ в Сумській області досягли рівня США, які є одними із світових лідерів щодо поширення даної патології. Так, у США, захворюваність на РЩЗ в 2012 р. становила 14,9 на 100 тис. нас., в Україні – коливалась у межах 6,6 (2012 р.), 7,5 (2013 р.) – 6,8 (2014 р.) на 100 тис. нас., на Сумщині – зростала з 10,3 (2012 р.) та 11,2 (2013 р.) до 15,1 (2014 р.) на 100 тис. нас. [1, 4].

Метою роботи є імуногістохімічне дослідження тканини папілярного раку щитоподібної залози за умов наявності та відсутності явищ біомінералізації.

Матеріали та методи.

Дослідження виконували на біопсійному матеріалі, одержаному під час оперативних втручань із приводу ПРЩЗ, що здійснили у Сумському обласному клінічному онкологічному диспансері (СОКОД). Усі випадки ПРЩЗ обстежили

клінічно (УЗД ЩЗ) і морфологічно (серійні зрізи пухлинної тканини) для виявлення патологічної біомінералізації. Дослідили 30 зразків ПРЩЗ з ознаками біомінералізації та 30 зразків ПРЩЗ без біомінералізації. Усіх пацієнтів із ПРЩЗ, у яких виявлені ознаки патологічної біомінералізації, об'єднали в I групу (30 осіб) – 27 жінок та 3 чоловіки. До II групи (30 осіб – 24 жінки та 6 чоловіків) увійшли хворі, які мали ПРЩЗ без ознак мінералізації.

Гістологічний та гістохімічний методи

Із гістологічних парафінових блоків виготовляли серійні зрізи товщиною 4–5 мкм, які наносили на адгезивні скельця SuperFrost (Thermo Scientific) і висушували за температури 37 °C впродовж 18 годин. Демарфінізовані зрізи підлягали демаскуванню антигенів за термічним методом шляхом нагрівання зрізів у цитратному буфері (pH 6,0) за температури 95–98 °C. Для візуалізації результатів ІГХ використовували систему детекції “UltraVision Quanto Detection System HRP Polymer” (Thermo Scientific), яка включала блокування ендогенної пероксидазної активності 3 % перекисом водню, блокування неспецифічного фонового фарбування з використанням «Ultra V Block», посилення реакції «Primary Antibody Amplifier Quanto». Як хромоген використовували діамінобензидин (DAB).

У дослідженнях використана така панель антитіл («Thermo Scientific», США, «Santa Cruz Biotechnology, Inc.»*, USA) (табл. 1):



Таблиця 1 – Панель антитіл для імуногістохімічного дослідження

Антитіло	Імунізована тварина	Клон	Розведення	Локалізація в клітині
Ki-67	Кролик	SP6	1:100	Ядро
p53	Миша	SP5	1:100	Ядро
Vax*	Миша	sc-20067	1:200	Цитоплазма
Vcl-2	Миша	100/D5	1:100	Цитоплазма
OPN	Кролик	Поліклон	1:100	Цитоплазма
MMP1	Кролик	Поліклон	1:50	Цитоплазма
VEGF	Кролик	Поліклон	1:200	Цитоплазма та мембрана

Для оцінювання ступеня вираженості імуногістохімічного забарвлення використовували модифіковану бальну систему за Allred [5]. Ступінь забарвлення оцінювали за 8-бальною системою (0–8). Кількість балів одержували шляхом додавання числа, що становило відсоток

клітин із позитивним забарвленням (0, 1, 2, 3, 4, 5), з числом балів, яке відображає інтенсивність забарвлення клітини (цитоплазми, ядра або цитоплазми і ядра одночасно – 0, 1, 2, 3). Система підрахунку відображена у таблиці 2.

Таблиця 2 – Система оцінки експресії імуногістохімічного забарвлення

Відсоток позитивно забарвлених клітин		Інтенсивність забарвлення	
0	Відсутні забарвлені клітини	0	Забарвлення відсутнє
1	Кількість забарвлених клітин < 1 %	1	Слабке забарвлення
2	Кількість забарвлених клітин 1–10 %	2	Помірне забарвлення
3	Кількість забарвлених клітин 10–33 %	3	Виразне забарвлення
4	Кількість забарвлених клітин 33–66 %		
5	Кількість забарвлених клітин > 66 %		

Як контроль якості проведеного ІГХ-дослідження проводили активний (використання тканини з попередньо встановленою позитивною та негативною реакцією) та пасивний контроль одержаних результатів.

Статистичний аналіз

Оброблення даних проводили прикладними статистичними методами за допомогою програми Microsoft Excel 2010 з додатком AtteStat 12.0.5.

Результати досліджень були перевірені на нормальний розподіл (НР) за критерієм Шапіро – Уїлка (Shapiro – Wilk). Більшість результатів вимірювань та імуногістохімічних досліджень мали неправильний розподіл, тому для оцінювання статистичної значущості використали непараметричний критерій Манна – Уїтні (Mann – Whitney). У разі якщо вибірки даних мали правильний розподіл, їх порівняння проводили за допомогою параметричного t-критерію Стьюдента за умови підтвердження випадковості розбіжностей ($F_{крит} > F_{екс}$) згідно з критерієм Фішера. Якщо $t_{екс} \geq t_{крит}$, то різниця вважалася достовірною.

Результати дослідження

Для вивчення проліферативної активності пухлинних клітин у ПРЦЗ застосовували імуногістохімічне дослідження експресії ядерного білка Ki-67. Забарвлення ядер хромогеном означало початок поділу (фази премітотичної підготовки G₁-, S- або G₂ -фази) або стан поділу (M-фаза) клітини. Таким чином, дослідження експресії білка Ki-67 дозволяє оцінити весь проліферативний потенціал пухлинної тканини ПРЦЗ.

При оцінюванні імуногістохімічної експресії Ki-67 у тканині ПРЦЗ з проявами біомінералізації у всіх випадках відзначалася експресія білка Ki-67 (кількість позитивно забарвлених ядер клітин > 1 %). Кількість проліферувальних клітин у пухлинній тканині ПРЦЗ у всіх випадках перевищувала кількість таких самих клітин в оточуючій не пухлинній тканині ПРЦЗ. Серед досліджуваних випадків ПРЦЗ у 6 (20 %) реакцію вважали слабкопозитивною (1 % < n < 10 %). Окремі випадки мінералізованого ПРЦЗ на перший погляд мали високу проліферативну активність, але при дослідженні на великому збільшенні (x 400) виявлялося, що частину проліферувальних клітин складають фібробласти, лімфоцити та інші клі-



тинні елементи пухлинного мікрооточення. Особливо яскраво це помітно у внутрішньопухлинних лімфатичних вузликах, де експресія Ki-67 найбільш виразно проявляється у центрах розмноження. 18 випадків ПРЦЗ (60 %) характеризувалися помірно позитивною реакцією ($10\% < n < 20\%$). У 6 випадках (20 %) в ядрах пухлинних клітин була визначена сильнопозитивна імуногістохімічна реакція Ki-67 ($20\% < n < 100\%$) (рис. 1 А).

Для дослідження здатності тканини ПРЦЗ до апоптозу було проведено дослідження рівня експресії білка p53. Імуногістохімічну реакцію вважали позитивною за умови забарвлення більше 5 % ядер пухлинних клітин. У першій групі одержані такі результати: у 18 випадках (60 %) у тканинах ПРЦЗ була виявлена слабкопозитивна реакція ($5\% < n < 20\%$) (рис. 1 В), у 6 випадках (20 %) – помірно позитивна реакція ($20\% < n < 50\%$) та в 1 зразку (3,33 %) була встановлена сильнопозитивна реакція ($50\% < n < 100\%$) на наявність антиапоптотичного білка p53. Для 5 зразків мінералізованої тканини ПРЦЗ імуногістохімічна реакція була оцінена як негативна ($n < 5\%$).

Сімейство білків bcl-2 становлять 17 клітинних білків, які мають широкий спектр активності відносно апоптотичних процесів. Субсімейство близьких до bcl-2 за морфологією білків (bcl-2, bcl-XL, bcl-w та ін.) пригнічує апоптоз, в той час як білки субсімейств bax и bN3 активують апоптотичні процеси. Функціональна різниця між близькими за структурою молекулами цього сімейства білків полягає у впливі на вивільнення цитохрому С з мітохондрій. Bax та близькі до нього білки формують канали в мембрані мітохондрій, через які в цитоплазму клітини виходить цитохром С. Білки-антагоністи bcl-2 та bcl-XL пригнічують вивільнення цитохрому С шляхом зниження здатності білка bax до формування каналів. Крім того, bcl-2 та bcl-XL здатні безпосередньо зв'язувати цитохром С і витіснити його з апоптосоми, попереджуючи таким чином активацію каспаз [6].

Для білка bax характерна цитоплазматична локалізація. Експресія гена bax регулюється білком p53, що показує його залучення до p53-опосередкованого апоптозу [7].

При оцінюванні імуногістохімічної реакції на білок bax у тканині ПРЦЗ зразків I групи позитивна імуногістохімічна реакція була наявна у

всіх досліджуваних випадках. Пухлинні клітини характеризуються інтенсивною експресією проапоптотичного білка bax: тканинної структури пухлини (сосочки, псевдофолікули, солідні ділянки) та окремі ракові клітини чітко забарвлюються, що особливо помітно на фоні інтактних тканин ПРЦЗ та стромального компонента (рис. 1 С). Основна маса зразків – 20 (66,67 %) – мала сильнопозитивну експресію bax, у 8 випадках була помірна експресія цього білка (26,6 %). Лише у 2 випадках ПРЦЗ (6,67 %) відзначалася слабкопозитивна імуногістохімічна експресія bax.

Експресія білка bcl-2 у «мінералізованій» тканині ПРЦЗ оцінюється як неінтенсивна, якщо порівнювати з експресією спорідненого білка bax. У пацієнтів I групи переважає слабкопозитивна (18 випадків) імуногістохімічна реакція на наявність bcl-2. Інші зразки відповідали помірно позитивній (6 випадків), негативній (5 випадків) експресії антиапоптотичного білка bcl-2 (рис. 1 D). Як виняток, в 1 зразку ПРЦЗ була виявлена сильнопозитивна реакція.

Остеопонтин (OPN) – кислий фосфопротеїн, який бере участь у багатьох клітинних процесах, включаючи міграцію, розмноження і міжклітинні взаємодії [8]. Він є прозапальним цитокіном, що підсилює ремоделювання судин і ангиогенез, попереджує апоптоз клітин. Також було показано, що OPN входить до складу ниркових каменів і впливає на їх формування, беручи таким чином участь в процесах біомінералізації [9]. Злоякісні пухлинні клітини різних локалізацій показують експресію OPN [10].

Переважає більшість зразків ПРЦЗ з біомінералізацією (90 %) при імуногістохімічному дослідженні показала сильнопозитивну (15 випадків) і помірно позитивну (12 випадків) реакцію на наявність OPN (рис. 1 E). Лише в 3 випадках (10 %) реєструвалася слабкопозитивна експресія білка. Високий рівень експресії OPN демонстрували як пухлинні клітини, так і клітини пухлинного мікрооточення.

Фактор росту ендотелію судин (VEGF) є центральним стимулятором росту нових судин. Цей білок збільшує судинну проникність, посилює проліферацію та міграцію ендотеліальних клітин, активацію протеаз (зокрема, MMP1), пригнічує апоптоз ендотеліоцитів, стабілізує судини [11]. Експресія VEGF залежить від ступеня гіпоксії тканини, ацидозу, активації онкогенів, деяких цитокінів та гормонів [12].

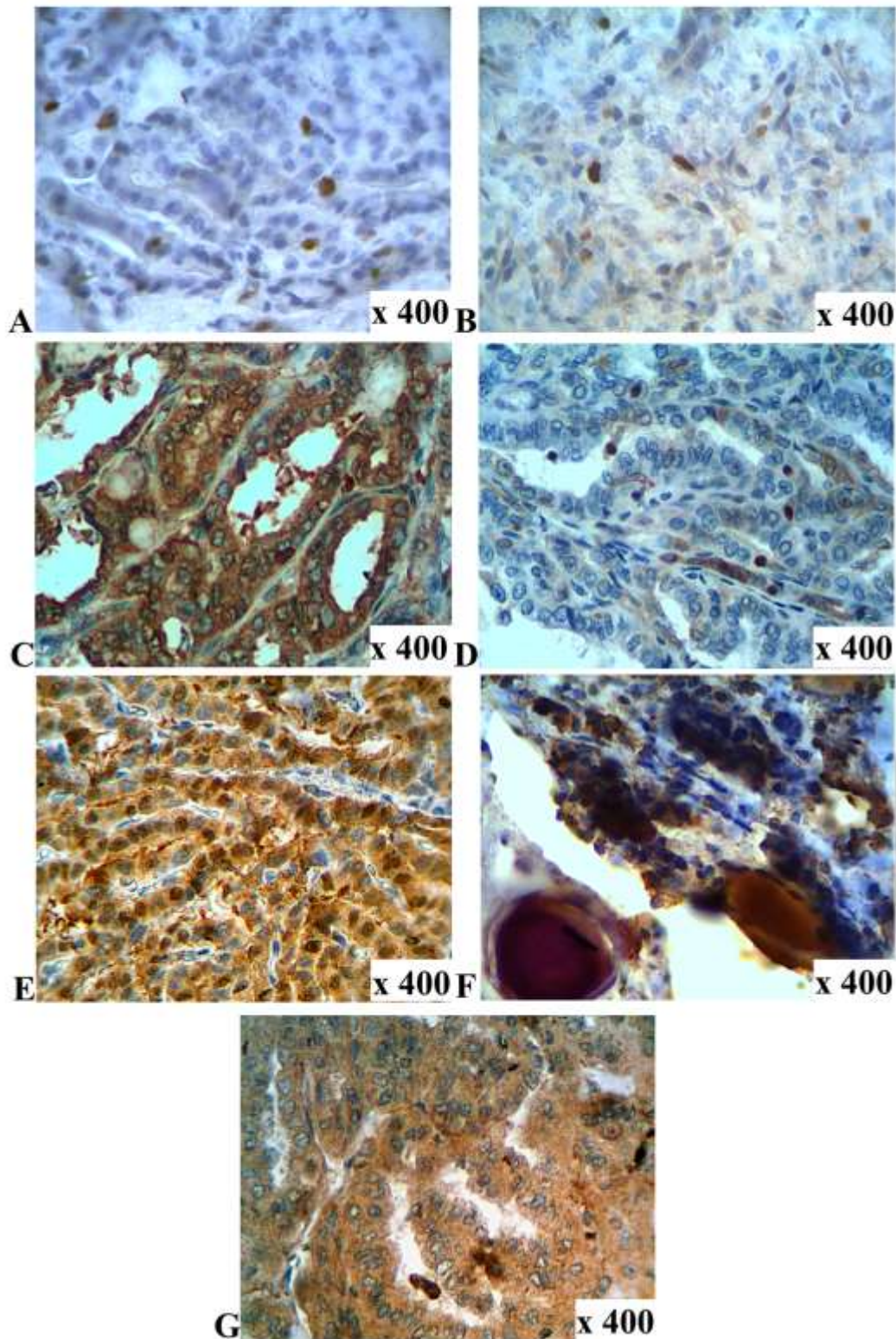


Рисунок 1 – Імуногістохімічне дослідження тканини ПРЦЗ з ознаками біомінералізації: А – Ki-67; В – p53; С – bax; D – bcl-2; E – OPN; F – VEGF; G – MMP1. Збільшення x 400

Імуногістохімічне дослідження мінералізованої тканини ПРЦЗ на предмет експресії фактора росту ендотелію судин демонструє переважно сильнопозитивну (30 %) та помірно позитивну (43,33 %) реакції. Також у 5 (16,67 %) та 3

(10 %) випадках ПРЦЗ було виявлено слабкопозитивну та негативну експресії VEGF. У переважній більшості випадків досліджуваний білок локалізувався в цитоплазмі пухлинних

клітин, які формували пухлинні сосочки та псевдофолікули (рис. 1F).

Матриксна металопротеїназа 1 (MMP1) належить до сімейства цинковмісних металопротеїназ, маючи в активному центрі Zn^{2+} [13]. У пухлинній тканині MMP1, руйнуючи колаген, розщеплює екстрацелюлярний матрикс, що сприяє процесам інвазивного росту та метастазуванню злоякісних клітин [14]. Таким чином, експресію MMP1 відносять до прогностично несприятливих факторів, характеризуючи інвазивну спроможність пухлини та її метастатичний потенціал.

У ході імуногістохімічного дослідження виявлено, що переважна частина зразків «мінералізованих» ПРЦЗ має сильновиражену та помірно виражену експресію MMP1: у 8 (26,67 %) та 10 випадках (33,33 %) відповідно (рис. 1 G). Основною локалізацією білка була цитоплазма пухлинних клітин, крім того імуногістохімічне забарвлення спостерігалось і в клітинах пухлинного мікрооточення (фібробластах, макрофагах). Також у 6 випадках ПРЦЗ була виявлена слабкопозитивна реакція (20 %), а в інших 6 зразках (20 %) експресія MMP1 оцінювалася як негативна.

Оцінювання імуногістохімічної експресії Ki-67 у тканині ПРЦЗ II групи показало позитивну імуногістохімічну реакцію білка Ki-67 у всіх досліджуваних випадках. Пухлинна тканина за своїм проліферативним потенціалом переважає над оточуючими інтактними тканинами ПРЦЗ. Ki-67-позитивні клітини локалізувалися в пухлинних псевдофолікулах та сосочках (рис. 2 A). Кількість випадків із слабкопозитивним забарвленням ядер пухлинних клітин ПРЦЗ без явищ мінералізації дорівнювала 6 (20 %), що відповідало такому самому показнику I групи. Лише у 3 випадках ПРЦЗ (10 %) відзначалась сильнопозитивна імуногістохімічна експресія Ki-67. Основну масу у II групі ПРЦЗ складала зразки з помірно позитивною реакцією – 21 (70 %).

Для групи випадків ПРЦЗ без наявної біомінералізації також була виявлена низька експресія білка p53. Частина випадків (9) характеризувалася відсутністю експресії p53 (рис. 2 B), імуногістохімічна реакція вважалася негативною (30 %). У 12 випадках (40 %) була виявлена слабкопозитивна імуногістохімічна реакція, у 6 випадках (20 %) – помірно позити-

вна реакція та в 3 зразках (10 %) була встановлена сильнопозитивна реакція на білок p53.

Дослідження рівня експресії *bax* в тканині ПРЦЗ без біомінералізації засвідчує її значно меншу інтенсивність. Так, у пацієнтів II групи спостерігається переважання слабкопозитивної (16 випадків) та помірно позитивної (11 випадків) експресій білка *bax* (рис. 2 C). Як екстремальні результати сильнопозитивна і негативна реакції спостерігалися в 2 і 1 випадках відповідно.

Визначення експресії білка *bcl-2* у зразках II групи ПРЦЗ показало переважання слабкопозитивної (19 випадків) імуногістохімічної реакції (рис. 2 D). Також у цій самій групі спостерігалися помірно позитивна (6 випадків), негативна (4 випадки) імуногістохімічні реакції на виявлення білка *bcl-2*. Аналогічно до першої групи в 1 зразку ПРЦЗ була виявлена сильнопозитивна експресія *bcl-2*.

Під час дослідження імуногістохімічної експресії *OPN* у тканині ПРЦЗ без ознак мінералізації відмічалось превалювання помірно позитивної реакції – 24 випадки (80 %). В 1 випадку (3,33 %) ПРЦЗ була зареєстрована негативна реакція, а в 5 зразках (16,67 %) – слабкопозитивна експресія *OPN*. Основною локалізацією експресії *OPN* була цитоплазма пухлинних клітин (рис. 2 E). Також спостерігалась псевдо-позитивна реакція анти-*OPN* антитіл з колоїдом, яка, очевидно, ґрунтується на молекулярній подібності глікопротеїнів колоїду та *OPN*.

Під час вивчення особливостей експресії *VEGF* в тканині пухлин ПРЦЗ II групи було встановлено сильнопозитивну імуногістохімічну реакцію в 5 випадках (16,67 %), помірно позитивну реакцію – в 9 випадках (30 %), слабкопозитивну реакцію – в 12 випадках (40 %) (рис. 2. F); 4 (13,33 %) зразки ПРЦЗ були оцінені, як негативно забарвлені, оскільки не проявляли ознак експресії *VEGF*.

Імуногістохімічне дослідження експресії MMP1 у II групі зразків демонструвало такі результати: у 3 випадках (10 %) експресії MMP1 не виявлено, 13 випадків (43,37 %) ПРЦЗ мали слабкопозитивну реакцію, у 8 випадках (26,67 %) виявлена помірно позитивна експресія та у 6 випадках (20 %) – сильнопозитивна експресія MMP1 (рис. 2 G) відповідно.

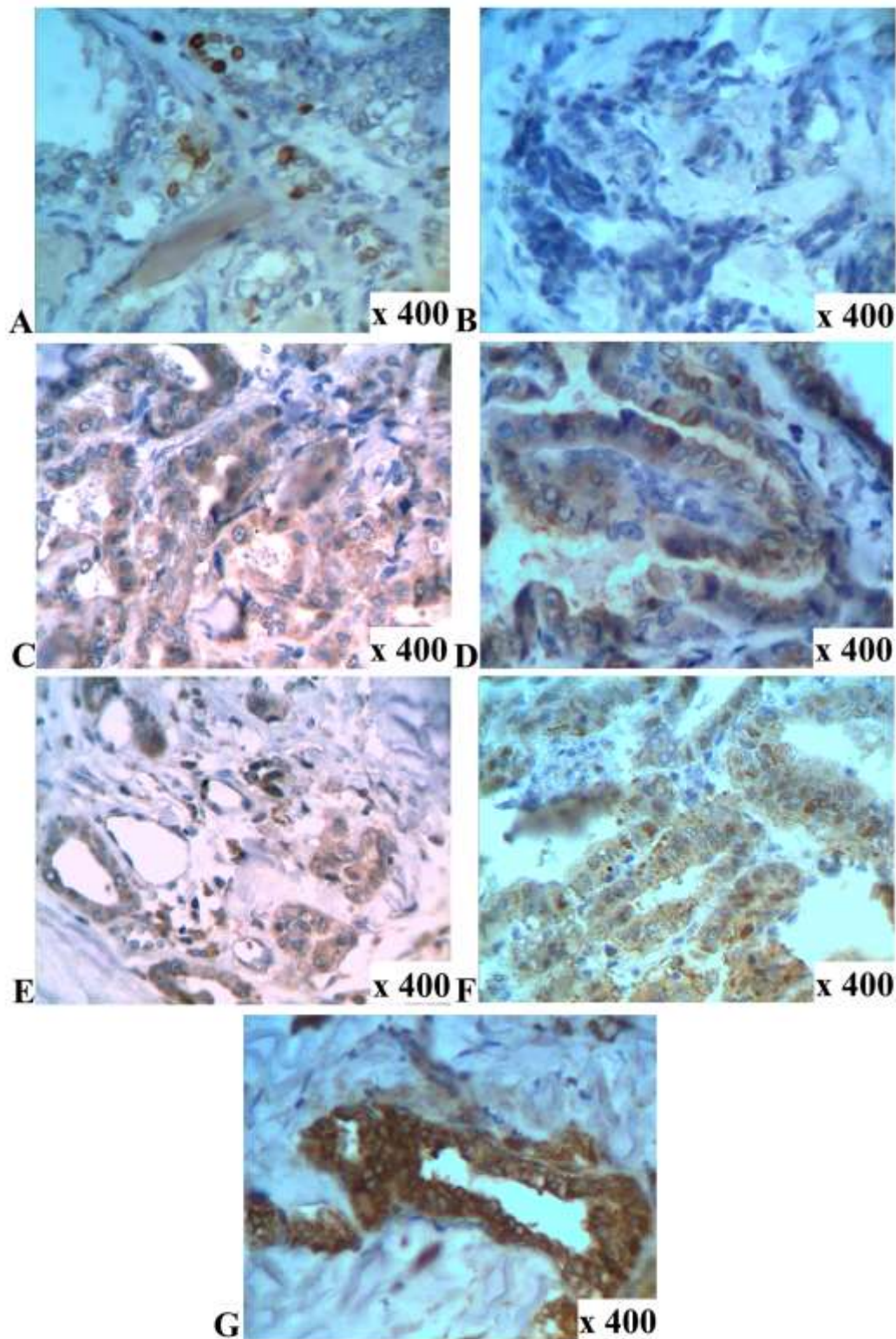


Рисунок 2 – Імуногістохімічне дослідження тканини ПРЦЗ без ознак біомінералізації: А – Ki-67; В – p53; С – bax; D – bcl-2; E – OPN; F – VEGF; G – MMP1. Збільшення x 400

Обговорення результатів

Результати бального оцінювання імуногістохімічного дослідження експресії Ki-67 в тканині ПРЦЗ за наявності ($5,6 \pm 0,25$) та відсутності ($5,23 \pm 0,26$) явищ біомінералізації показують

факт відсутності достовірної різниці рівнів експресії цього маркера проліферації ($p > 0,22$). При порівнянні результатів оцінювання імуногістохімічного дослідження експресії p53 в тканині ПРЦЗ за наявності ($3,5 \pm 0,31$) та відсутності

($3,7 \pm 0,35$) явищ біомінералізації очевидна відсутність достовірної різниці рівнів експресії цього маркера ($p > 0,42$).

Під час порівняння результатів імуногістохімічного дослідження експресії білків *bax* у тканині I групи ПРЦЗ ($6,87 \pm 0,22$) та II групи ПРЦЗ ($4,33 \pm 0,26$) виявлено її достовірно вищий рівень у групі пацієнтів з явищами біомінералізації ($p < 0,001$). Це може свідчити про можливий проапоптотичний вплив біомінералізації на пухлинні клітини ПРЦЗ. На відміну від *bax* порівняння кількості експресованого антиапоптотичного білка *bcl-2* у досліджуваних групах не відрі-

зняється (відповідно ($3,5 \pm 0,28$) та ($3,6 \pm 0,28$), $p > 0,8$).

Під час дослідження експресії MMP1 між I ($4,8 \pm 0,4$) та II групами ($4,77 \pm 0,31$) зразків ПРЦЗ достовірної різниці не було виявлено ($p > 0,95$).

Статистичне оцінювання достовірності різниці результатів імуногістохімічного дослідження білка VEGF показує достовірність різниці його експресії між групою зразків з явищами біомінералізації ($5,5 \pm 0,34$) та групою зразків з відсутністю проявів кальцифікації ($4,5 \pm 0,36$) ($p < 0,049$).

Таблиця 3 – Визначення достовірності різниці між результатами ІГХ-дослідження I та II груп зразків ПРЦЗ

Маркер	I група			II група			p	Статистичний критерій
	розподіл даних	середнє значення, M	σ	розподіл даних	середнє значення, M	σ		
Ki-67	н	5,6	0,25	ннр	5,23	0,23	0,22	Манна – Уїтні
p53	н	3,5	0,31	н	3,7	0,35	0,42	Стьюдента
<i>bax</i>	ннр	6,87	0,22	н	4,33	0,26	0,001	Манна – Уїтні
<i>bcl-2</i>	н	3,5	0,28	н	3,6	0,28	0,8	Стьюдента
OPN	ннр	6,4	0,22	ннр	5	0,16	0,001	Манна – Уїтні
MMP1	н	4,8	0,4	н	4,76	0,31	0,94	Стьюдента
VEGF	н	5,5	0,34	н	4,5	0,36	0,049	Стьюдента

Примітка: нр – нормальний розподіл даних; ннр – ненормальний розподіл даних; M – середнє значення; σ – середнє квадратичне відхилення

Різниця між результатами імуногістохімічного дослідження експресії *bax* ($p < 0,001$), OPN ($p < 0,001$) та VEGF ($p < 0,05$) у групах зразків ПРЦЗ з наявністю та відсутністю біомінералізації може свідчити про їх участь у процесах патологічної біомінералізації за умов даної патології.

Так, наявність біомінералізації поєднується з достовірно вищим рівнем експресії *bax* у тканині злоякісної пухлини ПЦЗ. Висока експресія білка *bax* та низька експресія його антагоніста *bcl-2* свідчать про посилення апоптозу у пухлинних клітинах.

Наявність патологічної біомінералізації призводить до високих рівнів експресії білка OPN у тканині ПРЦЗ. З іншого боку, зразки ПРЦЗ без кальцифікатів мають достовірно нижчий рівень експресії цих білків. Відомо, що остеопонтин є кислим фосфопротеїном, що експресується у мінералізованих тканинах та інгібує утворення гідроксіапатиту, зв'язуючись з поверхнею кристалів [15]. Можна припустити, що гіперпродукція

остеопонтину пухлинними клітинами є фактором протидії біомінералізації ПРЦЗ.

Також було перевищення експресії фактора росту ендотелію у групі зразків ПРЦЗ з кальцифікацією над групою ПРЦЗ без кальцифікації ($p < 0,05$). Оскільки білок VEGF відповідає за відновлення подачі кисню до тканин в ситуації, коли циркуляція крові недостатня [16], це може свідчити про більш високий рівень гіпоксії у мінералізованих тканинах ПРЦЗ. Більшість випадків ПРЦЗ містять псамомні тільця (у 24 випадках з 30), які утворюються у просвітах дрібних і середніх судин; у 5 випадках ПРЦЗ спостерігалася кальцифікація стінок судин. Біомінералізація у зазначених випадках призводить до ушкодження ендотелію та гіпоксії, що могло викликати підвищення експресії VEGF у відповідь.

Загалом, оцінюючи вплив біомінералізації на перебіг ПРЦЗ, можна говорити про її сприяння захисним силам організму, яке полягає в посиленні апоптозу в пухлині, механічному обмеженні поширення та росту пухлини.



Висновки

1. Наявність біомінералізації поєднується з достовірно вищим рівнем експресії бах у тканині злоякісної пухлини ПЦЗ. Висока експресія білка бах та низька експресія його антагоніста bcl-2 у мінералізованій тканині ПЦЗ свідчать про посилення апоптозу у пухлинних клітинах.
2. Високий рівень експресії фактора росту ендотелію (VEGF) може свідчити про більш високий рівень гіпоксії в тканині мінералізова-

ного ПЦЗ.

3. Гіперпродукція остеопонтину пухлинними клітинами є можливим фактором протидії біомінералізації ПЦЗ.

Таким чином, оцінюючи вплив біомінералізації на перебіг ПЦЗ, можна говорити про її сприяння захисним силам організму, яке полягає в посиленні апоптозу в пухлині, механічному обмеженні росту та поширенні пухлини.

References (список літератури)

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R [et al.]. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015; 136 (5):E359- E386.
2. Ebina A, Sugitani I, Fujimoto Y et al. Risk-adapted management of papillary thyroid carcinoma according to our own risk-group classification system: Is thyroid lobectomy the treatment of choice for low-risk patients? *Surgery*. 2014;156:1579–1589.
3. Davies L, Welch H.G. Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002 *JAMA*. 2006; 295:2164–2167.
4. Riezник А, Smeyanov V, Tarasenko S et al. Analysis of the incidence of malignant thyroid tumors in Sumy region. *J. Clin. Exp. Med. Res.* 2015;3 (4): 609–617.
5. Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod. Path.* 1998; 11:155–168.
6. Chipuk JE, Moldoveanu T, Lambi L et al. The BCL-2 family reunion. *Molecular Cell*. 2010;37:299–310.
7. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*. 1993;74 (4):609–19. doi:10.1016/0092-8674(93)90509-O. PMID 8358790.
8. Zhu B, Suzuki K, Goldberg HA et al. Osteopontin modulates CD44-dependent chemotaxis of peritoneal macrophages through G-protein-coupled receptors: evidence of a role for an intracellular form of osteopontin / B. Zhu, // *J Cell Physiol*. 2004 Jan;198(1):155-67.
9. Nemir M, DeVouge W, Mukherjee B. Normal rat kidney cells secrete both phosphorylated and nonphosphorylated forms of osteopontin showing different physiological properties. *J. Biol. Chem.*, 2007;164:18202 – 18208.
10. Mirza M, Shaughnessy E, Hurley J.K et al. Osteopontin-c is a selective marker of breast cancer. *Int J Cancer*. 2008; 122(1): 889–897. doi:10.1002/ijc.23204. PMID 17960616.
11. Osinsky S. Vaupel P. Tumor microphysiology. Kyiv, Naukova dumka. -2009. – 253 pp.
12. Kerbel R.S. Tumor angiogenesis: past, present and near future. *Carcinogenesis*. 2000;21:505–515.
13. Zhang C, Song X, Zhu M, Shi S. Association between MMP1-1607 1G>2G Polymorphism and Head and Neck Cancer Risk: A Meta-Analysis. *PloS One*. 2013; 2: 285–293.
14. Fanjul-Fernández M, Folgueras A. R, Fueyo A. et al. Matrix metalloproteinase MMP-1a is dispensable for normal growth and fertility in mice and promotes lung cancer progression by modulating inflammatory responses. *J Biol Chem*. 2013; 288: 14647-14656.
15. Scatena M, Liaw L, Giachelli CM. Osteopontin: A multifunctional molecule regulating chronic inflammation and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007; 27:2302–2309.
16. Ferrara N. The biology of VEGF and its receptors / N. Ferrara, H. P. Gerber, J. LeCouter. // *Nature Medicine*. – 2003. – № 9. – P. 669–676.

(received 24.06.2016, published online 28.06.2016)

(одержано 24.06.2016, опубліковано 28.06.2016)

