

УДК 616-006-002-018[579.24+549]:504

УКПП

№ держреєстрації № 0113U003315

Інв. №

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
СУМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
(СумДУ)

40007, м. Суми, вул. Римського-Корсакова, 2  
тел. (0542) 33-35-39 факс. (0542) 33-40-58

ЗАТВЕРДЖУЮ  
Проректор з наукової роботи  
д-р фіз.-мат. наук, професор  
Чорноус А.М.  
26.12.2017 м.п.

ЗВІТ  
З НАУКОВО-ДОСЛІДНИЦЬКОЇ РОБОТИ  
«МОРФОГЕНЕЗ ЗАГАЛЬНО-ПАТОЛОГІЧНИХ ПРОЦЕСІВ»

(остаточний)

Начальник НДЧ  
канд. фіз.-мат. наук, с.н.с

\_\_\_\_\_

Д.І. Курбатов

26.12.2017

Науковий керівник  
док.мед наук.

\_\_\_\_\_

А.М. Романюк

26.12.2017

2017

Рукопис закінчено 25 грудня 2017 р.

Результата цієї роботи розглянуто науковою радою СумДУ, протокол №4  
від 28 грудня 2017

## СПИСОК АВТОРІВ

Керівник НДР, Проф д.мед.п	<hr/> 26.12.2017	Романюк Анаолій Миколайович (реферат, вступ, висновки, розділи 1,2,3,4)
Відповідальний виконавець доц. к.мед.н.	<hr/> 26.12.2017	Москаленко Роман Андрійович (розділи 2)
Наук. Співроб., к.мед. н.	<hr/> 26.12.2017	Кузенко Євген Вікторович (розділ 3)
Мол.наук. співроб. К.мед.н.	<hr/> 26.12.2017	Линдін Миколай Сергійович (розділ 4)
Мол.наук. співроб.	<hr/> 26.12.2017	Сікора Владислав Володимирович (розділ 1)
Мол.наук. співроб. К.б.н.	<hr/> 26.12.2017	Гринцова Наталія Борисівна (розділ 4)
Мол.наук. співроб.	<hr/> 26.12.2017	Гирявенко Наталія Іванівна (розділ 1,2)
Мол.наук. співроб. К.мед.н.	<hr/> 26.12.2017	Сауляк Сергій Володимирович (розділ 1,2 )
Мол.наук. співроб. К.мед.н.	<hr/> 26.12.2017	Коробчанська Анна Борисівна (розділ 3, 4)
Мол.наук. співроб.	<hr/> 26.12.2017	Сулим Григорій Анатолійович (розділ 1, 2)
Мол.наук. співроб.	<hr/> 26.12.2017	Тімакова Олена Олександрівна (розділ 1,4)
Мол.наук. співроб.	<hr/> 26.12.2017	Гудименко Олена Олександрівна (розділ 1)
Мол.наук. співроб.	<hr/> 26.12.2017	Піддубний Артем Михайлович (розділ 4)

Мол.наук. співроб.	<hr/> 26.12.2017	Закорко Інна-Маргарита Сергіївна (розділ 1)
Мол.наук. співроб. Доц.,к.мед.н.	<hr/> 26.12.2017	Карпенко Людмила Іванівна (розділ 3)
Мол.наук. співроб. Доц.,к.мед.н.	<hr/> 26.12.2017	Будко Ганна Юріївна (розділ 1)
Мол.наук. співроб.	<hr/> 26.12.2017	Кравцова Ольга Іванівна (розділ 3)
Мол.наук. співроб.	<hr/> 26.12.2017	Ліндіна Юлія Миколаївна (розділ 1,2)
Мол.наук. співроб.	<hr/> 26.12.2017	Галенко Наталія Григорівна (розділ 1,2)

## РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 89 с., 1 табл., 14 рис., 67 джерела.

ДИСТРОФІЯ, ЗАПАЛЕННЯ, ЗАХВОРЮВАНІСТЬ, ЛІКУВАННЯ, РАК,  
ЕКОЛОГІЯ

*Об'єкт дослідження* - морфологічні зміни у тканинах організму за умов впливу несприятливих факторів.

*Предмет досліджень* молекулярнобіологічні, фізичні, морфологічні зміни у тканинах, хімічний склад тканини людини

*Методи дослідження:* гістологічні, гістохімічні, імуногістохімічні, електронікроскопічні, молекулярно-генетичні, енергофотометричні, статистичні.

*Мета:* Вивчити морфогенетичні особливості біомінералізації, запалення, пухлинного росту, компенсаторно пристосувальних процесів в умовах впливу на організм несприятливих факторів.

Для досягнення поставленої мети були визначені такі завдання:

1. Провести порівняльний аналіз структури захворюваності та клініко-морфологічні особливості запальних, дистрофічних, пухлинних процесів у мешканців в «екологічно-чистих» та «екологічно-забруднених» районах Сумської області за період 2004–2017 рр.

2. Вивчити елементний склад тканин з загально-патологічними процесами «екологічно-чистих» та «екологічно-забруднених» районів.

3. Встановити взаємозв'язок між накопиченням важких металів у тканині та особливостями морфологічної картини патологічного процесу в умовах мікроелементозу.

4. Виявити особливості рецепторного статусу тканини за умов мікроелементозу.

5. Дослідити участь мікроелементів у дестабілізації геному та метилуванні ДНК тканин.

В ході проведеної НДР уточнені та доповнені дані про патогенетичні ланки негативного впливу важких металів на канцерогенез та запальні процеси у молочній залозі, тканинах пародонта, залозистих тканинах які через внутрішньоклітинні посередники стимулюють процеси патологічної біомінералізації та васкуляризації, стабілізують прогностично-несприятливі протеїни, дестабілізують генетичний матеріал та блокують активність прогностично-сприятливих рецепторів. Виявлено взаємозв'язок між якісними змінами в тканинному мікрооточенні та особливостями рецепторного статусу клітин.

## ЗМІСТ

ВСТУП .....	6
1 МОРФОГЕНЕЗ ЗАГАЛЬНОПАТОЛОГІЧНИХ ПРОЦЕСІВ .....	14
1.1 Особливості патогенезу та морфогенезу запальних захворювань пародонта .....	14
1.2 Морфологічні особливості папілярного раку щитоподібної залози з біомінералізацією .....	46
1.3 Морфогенез інфільтративного протокового раку молочної залози в умовах забруднення довкілля солями важких металів .....	59
ВИСНОВКИ .....	72
ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ .....	79

## ВСТУП

Запалення пародонта як загальноомедичної проблеми пояснюється такими чинниками: по-перше, значним поширенням цієї патології у світі; по-друге, втратою зубів при цих захворюваннях; по-третє, появою вогнищ хронічної інфекції у зв'язку з виникненням патологічного утворення – зубоясенного кармана та зниженням реактивності організму (Елькова Н.Л., 2013). За даними ВООЗ, основну проблему в пародонтології становлять запальні ураження пародонта (The WHO Approach, 2005). При цьому виділяють гінгівіти (катаральний, гіпертрофічний, виразковий, атрофічний, десквамативний) і маргінальні періодонтити, коли клінічно та рентгенологічно визначаються пародонтальний зубоясенний карман та деструкція кісткової тканини.

Деякі автори вважають, що первинний запальний процес у яснах є пусковим із подальшим розвитком патологічного ясенного кармана та вторинної резорбції альвеол (Naffajee A.D., 2008). Інші автори вважають, що в окремих випадках пародонтит починається в яснах у вигляді хронічного запалення з подальшою резорбцією кісткової тканини альвеолярного відростку (Пузин М.Н., 2010).

Заслуговує на увагу те, що виникнення та погіршення перебігу пародонтиту, як правило, поєднуються з несприятливими факторами, які впливають на цілісний організм (Колпаков В.В., 2005). До цих факторів належать перенесені інфекційно-токсичні захворювання (Darveau R.P., 2014), порушення трофіки та обміну речовин (Курякина Н.В., 2000; Cyril O.I., 2004), зміни нейрогуморальної регуляції (Гинятулин И.И., 2009), віковий фактор (Ogawa H., 2004), порушення вітамінного балансу в організмі (Cyril O.I., 2004), імунні порушення (Парфёнов А.И. и соавт., 2012).

Ряд авторів пов'язує пародонтит із склерозом артеріальної системи пародонта: порушенням трофіки пародонта у зв'язку з недостатністю його кровопостачання з наявними склерозованими артеріями та звуженим їх просвітом, що призводить до зниження місцевого імунітету (Kshirsagar A.V., 2005). Зміни кінцевого судинного апарату пародонта обумовлені алергічними змінами судин пародонта (Kinane D.F., 2001). Дистрофічні процеси в організмі призводять, передусім, до появи пародонтальних карманів, резорбції кісткової тканини альвеолярного відростка (Hansson G.K., 2005). Істотна роль відводиться невrogenному фактору в патогенезі пародонтиту (Hashim N.T., 2012).

Розуміння механізмів порушень у пародонті на молекулярному рівні дає можливість розробити оптимальні заходи щодо їх діагностики, профілактики та лікування.

Одними з основних етіологічних чинників розвитку патології пародонта є бактерії (Paolantonio M.D., 2008), а також їх екзо- та ендотоксини (Geerts S.O., 2002; Naguib G., 2004), що опосередковано та безпосередньо спричиняють такі зміни: збільшення проникливості капілярів, яка зумовлює ексудативні прояви запального процесу; порушення лізосомальних мембран із виходом у клітину та за її межі лізосомальних гідролаз (Verzijl N., 2002), здатних пошкоджувати різні клітинні й тканинні компоненти (Noack B., 2001); стимулювання вироблення макроергічних сполук у процесах окисного та гліколітичного фосфорилування (Engebretson S.P., 2004); стимулювання синтезу медіаторів запалення (Salvi G.E., 1997); модифікацію субстрату запалення (Roberts A., 2002); зміну молекулярної конфігурації тканинних компонентів (Amir G., 2002); цитотоксичну дію (He H., 2004), що призводить до стимулювання проліферативної фази запалення та посилення запального процесу.

Спеціалізована терапія при пародонтитах спрямована на подолання наслідків порушень та втрат зубоепітеліального з'єднання (Aimetti M., 2012), ліквідацію зубоясенних нашарувань із великою кількістю мікроорганізмів, зменшення розростання грануляційної тканини (Cionca N. et al., 2009). Морфофункціональні зміни у пародонті при цьому є основними чинниками резорбції кісткової тканини і, як наслідок, – патологічне перенавантаження зубів, що спричиняє з часом повну елімінацію зубів (Kinney J.S., 2007). Це зумовлює втрату зубів із віком та великий відсоток втрати зубів у молодих людей. Тому зміни у пародонті вимагають значних витрат на лікування та протезування зубів.

Успіх лікування при пародонтитах залежить від своєчасності та тривалості терапії. При цьому перед лікарем-стоматологом постають такі завдання: 1 – дія на етіологічний чинник (van Winkelhoff A.J., 2002); 2 – вплив на ланки патогенезу – запальні, судинні, імунні та інші порушення (Skaleric U., 2004); 3 – відновлення або заміщення структур і функцій пародонта (Павленко О.В., 2003); 4 – дія на організм у цілому (Salvi G.E., 2005).

У контексті зазначеного особливу увагу дослідників при запальних процесах пародонта привертають процеси перебудови тканин, насамперед в епітелії та кістковій тканині.

Дослідженнями останніх років доведено, що ряд ДНК-репаративних систем мають ієрархічну структуру, яка частково елімінує вплив несприятливих факторів. Тканини пародонта в цьому сенсі не є винятком (Неруш Е.В., 2005). ДНК-репаративні системи зумовлюють функціональну та фізіологічну цілісність геному ДНК-вмісних органел клітин від продуктів із сторонньою генетичною інформацією, ендогенних перекисних та алкілувальних продуктів (Marcelina G.A., 2010). У більш широкому розумінні ДНК-репаративні системи реалізують захист дво- та одноланцюгової ниток



ДНК від пошкоджувальних речовин екзо- та ендogenous походження (Lakshmi N.U., 2012).

Вивченню прямої та непрямой алкілувальної дії бактеріальних токсинів на тканини пародонта людини та експериментальних тварин присвячені поодинокі праці зарубіжних авторів, в більшості яких доводиться негативний вплив цієї дії на органи та системи організму. М. Esteller (2000) зазначає, що клітини з високим ступенем метаболізму мають більш високий рівень репаративних ензимів, наприклад MGMT (O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase) та MMR (DNA mismatch repair). MGMT відіграє важливу роль у репаративних процесах. Це може бути пов'язано з великою швидкістю окисного гліколізу та активністю нітроксидсинтетази (Nadia G.Z., 2013). Ці реакції, у свою чергу, призводять до зростання рівнів таких ендogenous алкіляторів, як продукти перекисного окиснювання жирів, нітрозозамінів та амінокислот (Cooke M.S., 2003). Значна кількість синтезу ендogenous алкіляторів у клітинах пухлин через велику швидкість біохімічних реакцій посилює експресію відповідних захисних ензимів (MMR, MGMT) за принципом зворотної відповіді. До основних механізмів токсичної дії алкілувальних сполук необхідно віднести їх безпосередній та опосередкований вплив на ДНК, що відбувається за рахунок алкілування ферментних систем і пошкодження генетичного апарату клітини (Emery I.F., 2011).

Природа, етіологія та патогенез епулісів досі точно не встановлені і потребують подальшого вивчення. Одні автори вважають епуліси справжніми пухлинами або пухлиноподібними утвореннями, інші розцінюють їх як місцеву фіброзну остеодистрофію або результат регенераційно-відновного процесу, треті – як наслідок хронічних запальних або нейроендокринних порушень.

Вирішення вищезазначених проблем спрямоване не лише на одержання відповіді на ряд теоретичних питань стосовно алкілування клітин тканин пародонта, але й на запровадження нового наукового напрямку в стоматології, який має на меті дослідити основи розвитку захворювань пародонта з позицій патологічної анатомії, молекулярної генетики та патологічної фізіології.

Захворювання щитоподібної залози (ЩЗ) характеризуються надзвичайним поширенням серед населення і залежать від стану навколишнього середовища – забруднення поллютантами, радіонуклідами, йододефіциту, тощо [LiVolsi V., 2004; Howlander N., 2012]. Це обумовлює великі медичні та медико-соціальні проблеми у державі [Федоренко З.П., 2013].

Згідно даних всесвітнього дослідження захворюваності і смертності від злоякісних пухлин GLOBOSCAN у 2012 році було виявлено 298 тис. нових випадків раку щитоподібної залози (РЩЗ), що склало 2,1% від загальної кількості злоякісних пухлин. РЩЗ суттєво частіше зустрічається у жінок, ніж у чоловіків (3:1), займаючи частку 3,5% від загальної захворюваності на злоякісні пухлини. Найбільший високий рівень захворюваності на РЩЗ спостерігається у Північній Америці – 20 на 100 тис. населення серед жінок і 6,3 на 100 тис. серед чоловіків [Ferlay J., 2015]. Частка РЩЗ також має виразну тенденцію до зростання і в Україні. Цей показник щорічно зростав на 6–7% у період 1989–2013 років, становлячи в останні роки 4,4–5,5 на 100 тис. населення [Федоренко З.П., 2013]. Надзвичайне поширення патології щитоподібної залози (ЩЗ) в Україні пов'язують з багатьма факторами – такими, як аварія на Чорнобильській АЕС, відсутність йодопрофілактики, важка екологічна ситуація в багатьох регіонах України, покращення інструментальної діагностики [Мелеховець О.К., 2005; Горбенко В.Н., 2007].

Папілярний рак щитоподібної залози (ПРЦЗ) є найбільш поширеною формою раків цього органа, займаючи близько 70% у структурі захворюваності [LiVolsi V., 2011; Nikiforov Yu., 2016]. Незважаючи на те, що прогностично ПРЦЗ має сприятливий перебіг, в 5–20% випадків спостерігаються рецидиви, а близько 10% пацієнтів помирають від цієї хвороби [Lin J.-D., 2009]. Загальне виживання для більшості хворих залежить від гістологічних особливостей пухлини та багатьох інших предикторів. Одним з таких прогностичних факторів ПРЦЗ є патологічна біомінералізація, яка особливо часто є першим «тривожним дзвоником» при ультразвуковому дослідженні (УЗД) ЩЗ. Саме для ПРЦЗ характерний такий прояв мінералізації, як псамомні тільця (ПТ), що практично використовується для діагностики [Kwak J.Y., 2007].

Таким чином, існує цілий комплекс невирішених проблем, пов'язаних зі складністю диференційної діагностики патології ЩЗ, яка супроводжується процесами біомінералізації (кальцифікацією).

Рак молочної залози (РМЗ) займає перше місце серед усіх локалізацій злоякісних пухлин у жінок (30 % захворюваності і 16–18 % смертності). Щороку цю патологію виявляють у 16 тис. українок (Україна за показниками захворюваності на РМЗ посідає 5 місце у світі; рівень становить 64,5 на 100 тис. жіночого населення) (А.С. Зотов, 2005) – кожні 35–37 хвилин виявляється новий випадок захворювання та щогодини вмирає жінка від РМЗ. Це найбільш часта локалізація злоякісного процесу у мешканок США (реєструється у кожній восьмій жінки) та у мешканок європейських держав (у кожній десятої) (S.R. Lakhani et al., 2012; F.A. Tavassoli, 2003). Рівень захворюваності за останні 40 років збільшився більш ніж утричі. Згідно даних американських авторів при локалізованих стадіях РМЗ 5-річне виживання досягає 90%, при залученні підпахвинних лімфатичних вузлів – 68 %, а при виникненні віддалених метастазів – 18 % (В.Ф. Семиглазов, 2009).

Цій проблемі приділяється багато уваги в усьому світі, але досі невіршеними залишаються питання зниження захворюваності на РМЗ та смертності від нього. Не представляється можливим контролювати зростання захворюваності унаслідок відсутності ефективних шляхів первинної профілактики (Д.Г. Бухарин, 2011), залишаються відкритими питання діагностики РМЗ (В.В. Гаргін, 2015; І.І. Яковцова 2014).

Порівнюючи захворюваність на РМЗ у високорозвинених країнах Європи та Америки з країнами Азії та Африки, достовірним залишається факт більшого ураження населення у більш урбанізованих державах (Н.М. Verkooyen et al., 2003). Різна захворюваність у жінок похилого і молодого віку не може бути пов'язана тільки з порушенням гормонального стану та генетичною схильністю (С.К. Anders et al., 2009; E.V. Jensen, 2005; G. Rennert et al., 2007). Це дозволяє стверджувати, що навколишнє середовище та ендогенні порушення, поряд з іншими факторами, займають суттєве місце в ініціації та перебігу неоплазій молочної залози (D.M. Parkin et al., 2005).

Значні темпи індустриального розвитку, видобутку мінеральної сировини та енергетичних ресурсів призвели до збільшення антропологічних навантажень на довкілля. Це зумовило забруднення ґрунтів, поверхневих водних ресурсів і, як наслідок, продуктів харчування людини солями важких металів (СВМ). У зв'язку з цим постійно зростає інтерес до вивчення впливу СВМ на організм людини.

Іноді дисбаланс мікроелементів у тканинах має природне біогеохімічне походження – за умов проживання людини на території з підвищеним вмістом важких металів (ВМ) тощо (С.А. Рустембекова, 2006; М.В. Погорелов та співавт., 2010). При вивченні стану навколишнього середовища в Сумській області встановлено, що в Середино-Будському, Шосткинському, Ямпільському районах відмічається підвищення в ґрунті солей заліза, марганцю, хрому, міді, кобальту, нікелю, свинцю та цинку. Порівнюючи

статистичні дані захворюваності на РМЗ у вищезазначених регіонах (99,2 на 100 тис. населення) з умовно «екологічно-чистими» районами (Краснопільський, Тростянецький та Велико-Писарівський райони) Сумської області, де захворюваність складає 25,7 на 100 тис. населення, впливає закономірна достовірність більшого ураження жінок пухлинним процесом в «екологічно-забруднених» районах.

Хоча досить добре з'ясований вплив зазначених факторів на нирки, печінку, гіпофіз, наднирники, кісткову систему, кров, органи травлення (Е. Kuzenko, 2014; А.М. Романюк, 2013), на жаль, відносно мало досліджень присвячено вивченню впливу даних хімічних речовин на загальний стан здоров'я людини і ще менше – на участь у канцерогенезі. У тому числі не вивчено, як метали зумовлюють ініціювання та прогресування РМЗ.

Відомо, що канцерогенний вплив іонів ВМ реалізується як через механізми порушення структури ДНК своїм безпосереднім впливом на процеси транскрипції, трансляції та реплікації, так і через пригнічення системи антиоксидантного захисту. Деякі з іонів металів можуть порушувати функціонування клітин, а інші імітувати дію естрогену, впливаючи на гормональний стан жінки (М.В. Martin, 2003).

Можливість тканин накопичувати екзогенні речовини в умовах підвищеної їх кількості в навколишньому середовищі спонукає до вивчення спроможності тканини молочної залози акумулювати ВМ та з'ясувати механізми їхнього канцерогенного впливу на перебіг пухлинного процесу.

## 1 МОРФОГЕНЕЗ ЗАГАЛЬНОПАТОЛОГІЧНИХ ПРОЦЕСІВ

### 1.1 Особливості патогенезу та морфогенезу запальних захворювань пародонта

Стоматологічний стан і стан СОПР вивчали у 55 пацієнтів, які перебували на стаціонарному лікуванні у Сумській міській дитячій клінічній лікарні ім. Святої Зінаїди. Серед обстежених пацієнтів було зареєстровано 22 дівчаток і 33 хлопчики віком від 5 до 17 років. За діагнозами пацієнти були поділені таким чином: 34 (61,8 %) – захворювання ШКТ та 21 (38,2 %) – захворюваннями серцево-судинної системи (ССС). Серед обстежених: діти молодшого шкільного віку – 9 осіб (16,5 %); середнього – 24 осіб (43,5 %); старшого шкільного віку – 22 осіб (40 %). Пацієнтів обстежували за єдиною методикою, яка передбачала загальноприйняті клінічні дослідження порожнини рота. Стан пародонта, СОПР, язика та червоної облямівки губ оцінювали візуально.

У дітей хронічна гастроентерологічна та серцево-судинна патологія в 34,5 % випадків супроводжувалася погіршенням стану мікробіоценозу ротової порожнини (*Candida albicans*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Neisseria mucosa*, *Streptococcus mitis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*).

Основними асоціаціями мікроорганізмів у ротовій порожнині без ознак запалення були *Neisseria mucosa* та *Streptococcus mitis* – 7,2 %, а також *Neisseria mucosa* та *Staphylococcus epidermidis* – 8 %. При дисбіозі у ротовій порожнині без ознак запалення здебільшого висівалися *Candida albicans* – 46 %, *Candida albicans* та *Neisseria mucosa* – 26,6 %, *Staphylococcus haemolyticus* та *Candida albicans* – 4,33 %. При патології пародонта *Streptococcus pyogenes* – 2,17 %, *Candida albicans* – 100 %. Результати дослідження показали, що найбільш частими мікроорганізмами, які виділяються у дітей із ротової порожнини при запаленні пародонта, є

*Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Candida albicans*. Представники родини *Candida* були виділені у 93,3 % випадків. Серед представників кокової флори частіше за інших виявлялися *Staphylococcus epidermidis* – 50 %.

Стоматологічний стан і стан СОПР вивчали у 50 дорослих пацієнтів, які перебували на стаціонарному лікуванні у СОКЛ та зверталися до стоматологічного відділення (з 2013 по 2015 рр.). Серед обстежених пацієнтів було зареєстровано 25 жінок і 25 чоловіків віком від 18 до 80 років. За діагнозами пацієнти були поділені таким чином: 7 (14 %) – захворювання ШКТ, 8 (16 %) – захворювання системи кровотворення, 16 (32 %) – захворювання ССС, 19 (38 %) – хворі, які зверталися за консультацією до стоматологічного відділення. Молоді люди віком від 18 до 39 років становили 23 особи (46 %); люди середнього віку – від 40 до 59 років – 19 (38 %) осіб; старшого віку – від 60 до 80 років – 8 осіб (16 %). Пацієнтів обстежували за єдиною методикою, що передбачала загальноприйняті клінічні дослідження порожнини рота.

У досліджуваних пацієнтів у 98 % випадків висівалися *Candida albicans*, що супроводжується погіршенням стану мікробіоценозу ротової порожнини. Основні асоціації мікроорганізмів у ротовій порожнині показані у таблиці 1.

Ми вивчили динаміку захворюваності пародонта серед населення України (МКХ-10 код K05.0, K05.1, K05.2, K05.3, K05.5, K05.6). Із 1990 р. було охоплено всю територію України єдиною інформаційною системою збору даних національного канцер-реєстру та національною медичною статистичною системою.

Джерелом інформації щодо поширення хвороб пародонта серед населення (зареєстровано хвороб «усього») та захворюваності (зареєстровано захворювань уперше в житті) є звітна статистична форма 12 «Звіт про

захворювання, зареєстровані у хворих, які проживають у районі обслуговування лікувально-профілактичного закладу».

Таблиця 1- Мікрофлора ротової порожнини дорослих із хронічною соматичною патологією

	Хворі із захворюваннями ШКТ		Хворі із захворюваннями ССС		Хворі із захворюваннями системи кровотворення		Хворі, які зверталися за консультацією до стоматологічного відділення		Відсоток
	Ч	Ж	Ч	Ж	Ч	Ж	Ч	Ж	
Кількість хворих	n=7		n=16		n=8		n=31		
<i>C. albicans</i>	4	3	8	7	5	3	10	9	98
<i>Staph. haemolyticus</i>	1	2	2	8	2	1	3	2	42
<i>Neisseria</i>	1	2	1	3	4	2	0	4	34
<i>Strep. mitis</i>	3	–	3	5	5	–	7	5	56
<i>Staph. epidermidis</i>	–	–	4	5	4	–	1	1	30
<i>Strep. pyogenes</i>	–	–	7	6	1	2	7	9	64
<i>Campylobacter rectus</i>	4	1	4	6	–	2	10	7	68
<i>P. gingivalis</i>	–	3	8	4	3	2	1	8	58
<i>E. coli</i>	2	1	7	6	4	2	10	9	82



Ця форма затверджена Наказом МОЗ України від 10.07.2007 р. № 378 «Про затвердження форм звітності з питань охорони здоров'я та інструкцій щодо їх заповнення» із змінами та доповненнями, внесеними Наказом МОЗ України від 17.06.2013 р. № 511 «Про затвердження змін до Наказу МОЗ України від 10.07.2007 р. № 378».

Встановлено, що захворюваність на пародонтит залишається практично незмінною упродовж останніх років близько  $(0,27 \pm 0,02)$  та  $(0,23 \pm 0,01)$  випадку на 100 тис. населення у Чернігівській та Сумській областях). Проте запальні процеси пародонта більше поширені у Харківській області –  $(0,37 \pm 0,04)$  на 100 тис. населення (із 2008 до 2015 рр.). Певну роль у підвищенні рівня запальних процесів пародонта могли відіграти соціальні проблеми Харківщини.

Не виключено також, що за цей період відбувалося поступове покращення якості реєстрації захворювань пародонта в системі статистичного обліку Харківщини. Проте за останні роки ми також відзначаємо пік збільшення хвороб пародонта у Чернігівській та Сумській областях.

Пік захворюваності у 2011 р. становив 0,445 на 100 тис. населення у Харківській області. У Чернігівській та Сумській областях також спостерігалось підвищення захворюваності до 0,3 та 0,255 на 100 тис. відповідно. У Сумській області взагалі не відзначається значного збільшення захворюваності пародонта за весь досліджуваний період (Рисунок 1).

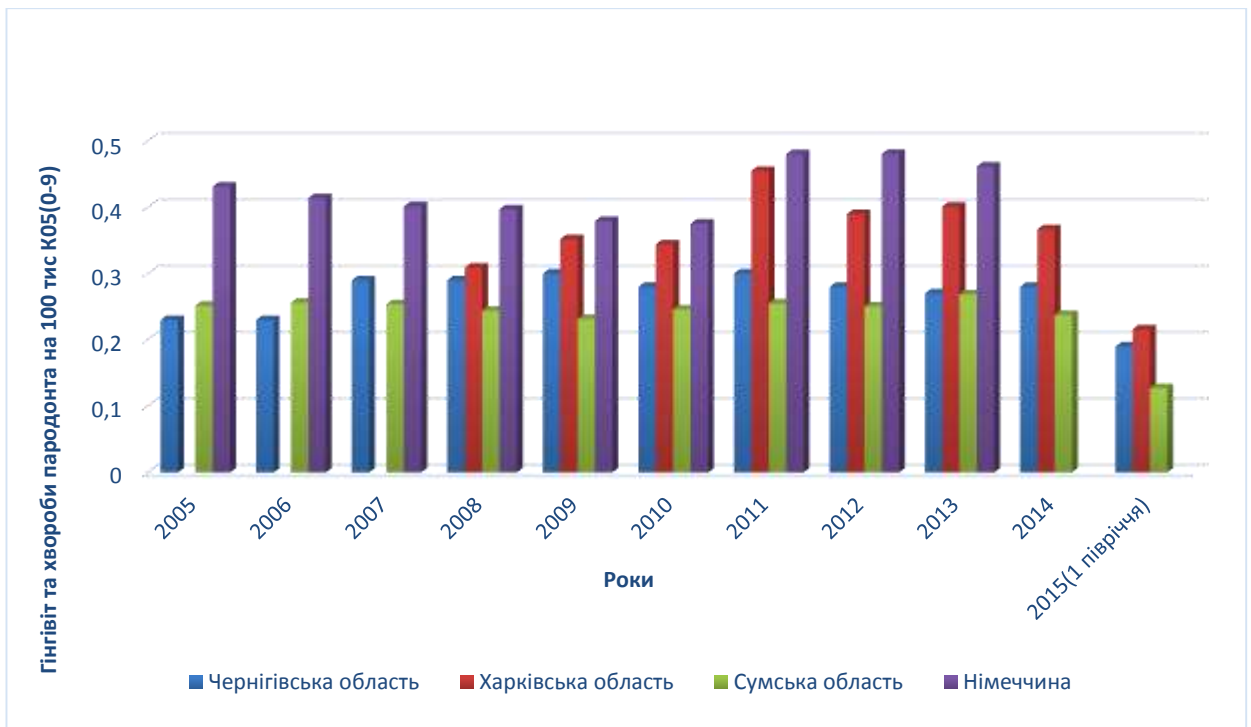


Рисунок 1.1 Захворюваність пародонта на Чернігівщині, Сумщині та Харківщині.

Аналіз статистичних баз даних Сумської області засвідчив, що 62 % випадків захворювання на пародонтити та епуліси виявлено в результаті самостійного звернення пацієнтів до лікувальних закладів і лише 19 % – в оглядових кабінетах, решта 19 % – при інших видах профілактичних оглядів.

Зазначимо, що під час вивчення стану реєстрації захворювань пародонта (K05.0, K05.1, K05.2, K05.3, K05.4, K05.5, K05.6) в Україні ці нозологічні форми не враховуються.

Разом із тим, необхідно відзначити, що останнім часом у розвинених країнах рівень захворюваності на пародонтити значно перевищує такі показники у нерозвинених країнах. Наприклад, за даними «UK Incidence Statistics» (Великобританія), у 2007 р. було виявлено 25 033 випадки різних типів епулісів, які є одним з захворювань пародонта.

Аналіз нормальності свідчить, що гіпотеза про нормальність вибірок Харківської області та Німеччини відхилена ( $X_{\text{сер}} = 0,27\%$   $S = 0,030\%$ ,  $X_{\text{сер}} = 0,33\%$   $S = 0,004\%$  відповідно), але підтвердилася гіпотеза про

нормальність розподілу вибірок Чернігівської та Сумської областей ( $X_{\text{сер}} = 0,19 \% S = 0,47 \% , X_{\text{сер}} = 0,15 \% S = 0,26 \%$ ).

Тому ми порівнюємо дані Чернігівської та Сумської областей, а дані Харківської області з даними Німеччини.

Дані Харківської області та дані Німеччини порівнювались з використанням параметричних критеріїв статистики – або критерію Стьюдента (t критерій Стьюдента 2,26 при  $P = 0,019$ ).

Дані Чернігівської та Сумської областей порівнювались з використанням критерію Спірмена (критерій Спірмена 0,77,  $P = 0,011$ ).

Гістологічні дослідження, які спрямовані на вивчення змін у тканинах пародонта при його запаленні, показують, що патологічний процес у пародонті часто призводить до горизонтальної та вертикальної резорбції кісткової тканини. Більшість фахівців погоджується з тим, що вертикальна втрата кістки з утворенням внутрішньокісткових карманів може відбутися в результаті безпосереднього поширення запалення в область періодонтальної зв'язки за наявності достатньої товщини кістки. Суперечності виникають під час обговорення факторів, що впливають на цей шлях поширення запалення.

Беручи до уваги важливість пародонтитів, ми вивчали експресію MMP-1 у тканинах пародонта при запаленні. MMP-1 синтезується фібробластами, хондроцитами, макрофагами, кератиноцитами, ендотеліальними клітинами та остеобластами. Наші дослідження доводять, що MMP-1 синтезується епітелієм ясен, що збігається з дослідженнями Дехмана М. (2001). Відомо, що активність MMP-1 стимулюється різними агентами (Uitto V.J., 2002), запальні процеси у пародонті також є стимулом, який спричиняє посилення експресії MMP-1. Ми спостерігали, що MMP-1 експресується супрабазально клітинами епітелію. Дослідження Уїтто В. (2001) показують, що епітеліальні острівці Малясе у стадії проліферації при запаленні пародонта експресують MMP-1. Разом з тим, результати наших досліджень показали, що експресія MMP-1 ясенним епітелієм підсилюється атеросклеротичними змінами в

організмі. Рівень MMP-1 збільшується при ревматоїдному артриті, остеоартриті, інвазії пухлини, виразкових процесах рогівки, при запальних захворюваннях кишок, тканинному ремоделюванні.

Епуліси різних видів також посилюють експресію MMP-1. Так, ми виявили сильний позитивний кореляційний зв'язок між MMP-1 та кількістю гранулоцитів (MPO) ( $r = 0,96$ ,  $p = 0,05$ ) у фіброзному епулісі і середній негативний кореляційний зв'язок між IgG, IgM та кількістю MMP-1 ( $r = -0,64$  та  $r = -0,53$  при  $p = 0,05$ ) відповідно, а також сильний кореляційний зв'язок при пародонтитах між MMP-1 та гранулоцитами. Це пояснюється тим, що у вогнищі запалення пародонта велика кількість нейтрофільних лейкоцитів виробляють цілий ряд медіаторів запалення і факторів ушкодження тканин Birkedal-Hansen H. (1993), що і зумовлює сильний кореляційний зв'язок цих показників. Той факт, що MMP-8 колагеназа 2, нейтрофільна колагеназа були вперше знайдені у нейтрофілах (Heinecke J.W., 1993), пояснює, чому нейтрофільна MMP-аза впливає на резорбцію тканин пародонта при його запаленні.

Нейтрофільні лейкоцити, макрофаги та плазмоцити створюють основний фактор, який впливає на перебіг запалення у тканинах пародонта, що підтверджується проведеним факторіальним аналізом  $F1 = -CD68 0,79 + S100 -0,81 + CD79A 0,79 + MPO 0,70$ .

Відомо, що CD79A позитивні клітини здатні до синтезу IgG та IgM, що підтверджується позитивним кореляційним зв'язком  $r = 0,44$  та  $0,4$  при  $p = 0,05$  відповідно при пародонтитах у наших дослідженнях.

Своїми дослідженнями ми встановили, що макрофаги (CD68) та їх активність (S100) входять до складу фактора 1 та сприяють прогресуванню пародонтиту. Дослідники на сучасному рівні виділяють дві протилежні популяції макрофагів (Murray P.J., 2011). M1-макрофаги – прозапальні клітини і пов'язані з пошкодженням тканин і їх запаленням, у той час як

макрофаги M2 пов'язані з відновленням тканин та їх фіброзом (Duffield J.S., 2003; Wynn T. A., 2010). Виходячи з того факту, що білок S100 відображає активність макрофагів (Xu K., 2000, 2001; Zheng L., 1995), ми можемо стверджувати, що активні макрофаги беруть безпосередню участь у посиленні морфологічних змін у пародонті при його запаленні. Ґрунтуючись на результатах кластерного аналізу, доведено загальний механізм участі активних макрофагів, нейтрофільних гранулоцитів, клітин В-ряду IgG та IgM у прогресуванні пародонтиту.

У наших дослідженнях доведено, що важливу роль у морфогенезі пародонтиту відіграє проліферація епітелію у базальних шарах під час запалення. Проліферація епітелію ясен супроводжується змішаноклітинною інфільтрацією прилеглої сполучної тканини ясен, склад та кількість клітин якої змінюється при посиленні запального процесу і варіантів імунореактивності організму на фоні загальносоматичного статусу. На межі епітелію і сполучної тканини у процесі запалення пародонта виявляється різна активність остеопонтину (OPN), який експресується неоднаково у різних шарах епітелію. На нашу думку, експресія OPN епітелієм при запаленні пов'язана з адгезивними функціями OPN молекул, що призводить до підсилення апікальної міграції епітелію (Scholzen T., 2000).

Посилена міграція епітелію супроводжується підвищеною експресією Кі-67 у базальному та парабазальному шарах (Шанін В.Ю., 1996). За літературними даними (Lappin C.P., 2001), Кі-67 відіграє значну роль в альтерації сполучної тканини шляхом збільшення пулу епітеліальних клітин із подальшим їх вростанням у прилеглу тканину. Ми встановили, що епітелій ясен у ділянках, прилеглих до запального інфільтрату при пародонтиті, починає проліферувати і експресувати високі рівні Кі-67, OPN та MMP-1. Кі-67-білок (також відомий як МКІ67) є клітинним маркером проліферації. Цей білок наявний у всіх активних фазах клітинного циклу (G1, S, G2 і мітозі), але відсутній у його G0-фазі (Гасюк Н.В., 2014). Епітелій зони епітеліального

з'єднання має «філогенетичну пам'ять» – вrostати в прилеглу первинну кістку ротової бухти. Вважають, що в утворенні епітелію зони епітеліального з'єднання, бере участь редукований епітелій емалевого органа, який покриває всю емаль непрорізаного зуба. Коли коронка зуба починає прорізуватися, редукований епітелій зливається з епітелієм ясен, перетворюючись на епітеліальне прикріплення, яке тісно зв'язане з базальною мембраною. Ми підтримуємо думку вчених (Fernanda Cassandri, 2012) про з'єднання кожного шару епітелію з базальною мембраною, що обумовлено її походженням.

На підставі проведених досліджень можна стверджувати, що запалення пародонта порушує остеогенез, при цьому резорбція кісткової тканини супроводжується розростанням грануляційної тканини, яка призводить до глибоких порушень у тканинах пародонта (Рисунок 2).

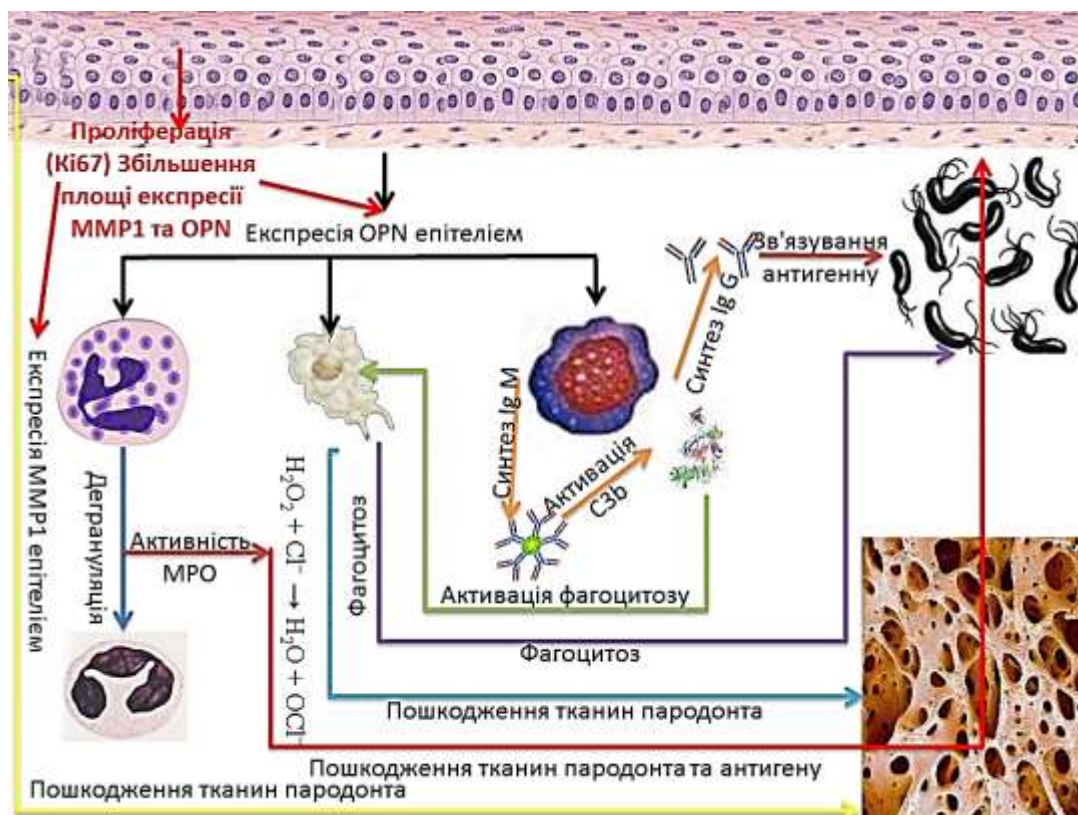


Рисунок 1.2 - Схема взаємозв'язку досліджуваних маркерів у тканині пародонта при запаленні.

Значні зміни у тканинах пародонта розвиваються при протезуванні з використанням сплавів, які містять хром та кобальт. Морфологічні зміни у тканині пародонта після 20-добового експерименту зі вживанням солей хрому характеризувалися поступовим вrostанням епітелію в пародонтальну щілину з прогресуючим руйнуванням ясенного краю та деструкцією більш глибоких підтримувальних структур. Отже, вплив іонів Cr (VI) сприяє поступовому руйнуванню всіх тканин пародонта. Горизонтальна втрата кісткової тканини під впливом Cr (VI) призводить до більш складних структурних змін.

Зміни тканин пародонта на 40-ву добу - відмічається широка остеокластична резорбція кісткової тканини, що призводить до збільшення ширини й глибини пародонтального кармана. Спостерігається формування глибоких внутрішньокісткових резорбтивних лакун, розширення судин та набряк власної пластинки. Зміни у пародонті на 40-ву добу під впливом кобальту характеризувалися широкою остеокластичною резорбцією кісткової тканини, з утворенням кісткових лакун та подальшим їх злиттям і, як наслідок, формуванням кісткового карману. При цьому спостерігається також розширення судин та набряк Шарпеевих волокон. Крім того, у тканинах пародонта за умов впливу іонів кобальту ми спостерігали підвищену проліферативну активність острівців Малясе, стаз у капілярах, зменшення альвеолярної кістки шляхом остеокластичної резорбції. Поступова кісткова резорбція призводила до заміни кісткової тканини на фіброзну. Потрібно відмітити, що руйнування тканин пародонта під впливом іонів кобальту нерівномірне. Здебільшого наявна лакунарна вертикальна резорбція. Локалізоване руйнування кістки навколо окремих зубів відсутнє.

У пародонті після 60-добового експерименту ми спостерігали такі морфологічні зміни: прогресування кореневого напрямку міграції

епітеліального прикріплення, застій та стаз у капілярах, зменшення альвеолярної кістки за рахунок остеокластичної резорбції. Поступова кісткова резорбція призводить до прогресу руйнування зубоутримувального апарату, в кінцевому підсумку резорбція спричиняє розхитування зубів. Руйнування тканин пародонта під впливом іонів хрому йде рівномірно по всій зубній дузі (горизонтальна втрата кісткової маси). Локалізоване руйнування кістки виникає навколо окремих зубів за рахунок вертикальної втрати кісткової маси та змін у сполучній тканині.

EDS аналіз показав, що неорганічна фаза кістки переважно складається з кальцій-фосфорвмісного гідроксиapatиту у вигляді основних компонентів із деякими незначними змінами, таких елементів, як  $\text{Cr}^{6+}$  і  $\text{K}^+$ . На 40-ву добу експерименту ми спостерігали найбільше зростання вмісту хрому. При цьому зростання хрому є статистично достовірним ( $P < 0,01$ ). Разом з тим збільшення вмісту іонів  $\text{K}^+$  після 40 днів спостереження було недостовірним ( $P > 0,05$ ). Після 60 днів експерименту спостерігалися найнижчі рівні  $\text{P}^{3-}$  і  $\text{K}^+$  ( $P < 0,01$ ). Такий іонний дисбаланс у тканинах пародонта під впливом іонів хрому може вплинути на морфологічну структуру та її тривкісні властивості.

Нами виявлена підвищена фрагментація ДНК під впливом іонів хрому у клітинах пародонта піддослідних тварин. Розриви з'являються саме в генах під час транскрипції. Однак у літературі є дані про те, що у тканинах гени, які транскрибуються, виходять у перших фракціях при елюції, що свідчить про наявність ендогенних розривів у транскрипційних послідовностях. Таким чином, сама по собі транскрипційна активність сполучена з внесенням розривів у ДНК. Можливо, що перебудова геному у зв'язку з переходом до стану надлишкового надходження іонів хрому вимагає внесення додаткових розривів. Не виключено, що певну роль у фрагментації ДНК можуть зумовлювати різні ферменти. Вони взаємодіють із транскрипційними послідовностями азотистих основ і беруть участь у генерації так званого детергентрозчинного ДНК-незв'язаного хроматину, який складається з



коротких фрагментів ДНК, збагачених транскрипційними послідовностями. Фермент MGMT, який у своєму складі містить іони  $Zn^{2+}$ , залежний центр – для репарування ендогеноалкілованих ділянок ДНК, замінюється на  $Cr^{6+}$  та обумовлює запуск процесу інтернуклеарної фрагментації ДНК.

У структурі патології пародонта завжди переважають запальні форми ураження, які в кінцевому підсумку призводять до тканинної деструкції та втрати зубів і кістки альвеолярного відростка щелеп. Разом із тим, поруч із запальними формами ушкодження пародонта трапляються епуліси або пародонтоми, які також часто призводять до резорбції альвеолярного відростка щелеп. У зв'язку з цим нам необхідно було:

- з'ясувати механізм розвитку епулісів та резорбції кісткової тканини;
- дослідити епуліси на предмет їх пухлинного чи запального походження;
- установити першоджерело у процесі епулісогенезу.

Проаналізувавши одержані результати кореляційного, факторіального та кластерного аналізів, ми прийшли до думки, що фіброзний епуліс – пародонтома запальної етіології.

Наявність негативного кореляційного зв'язку між Т-лімфоцитами (CD3) та гранулоцитарними лейкоцитами (MPO)  $r = -0,58$ ,  $p = 0,05$  дають підстави стверджувати про наявність циклічності перебігу запального процесу у фіброзному епулісі з періодами загострення та згасання запального процесу. Це підтверджує фундаментальний постулат: «під час гострого запального процесу переважають гранулоцитарні лейкоцити та нейтрофіли зокрема» (Hosokawa Y., 2005).

Ще одним фактом, який наводить нас на думку про «хвилеподібний» перебіг запального процесу у фіброзному епулісі є одержані нами дані, які показують від'ємний кореляційний зв'язок між клітинами макрофагального

походження (CD68) та В-лімфоцитами (CD79A)  $r = -0,54$   $p = 0,05$ . Реалізація цього механізму, на нашу думку, така: макрофаги, які виконують фагоцитарну функцію (M1-тип) або репаративну (M2-тип) призводять до зменшення кількості В-клітин за рахунок макрофагальних цитокінів (Verma R.P., 2007).

Дослідження кореляційного зв'язку між макрофагами (CD68) та їх активністю (S100)  $r = 0,93$ ,  $p = 0,01$  підтверджує активність процесу у фіброзному епулісі (Oxidized L.D.L., 2011).

Установлено, що основним фактором резорбції є MMP-1, яка продукується гранулоцитарними лейкоцитами (MPO), що підтверджується стійким позитивним кореляційним зв'язком між цими показниками ( $r = 0,96$ ,  $p = 0,001$ ). Необхідно зазначити, що в результаті проведеного нами імуногістохімічного дослідження, ми знайшли від'ємний кореляційний зв'язок між MMP-1 та кількістю клітин Т- та В-ряду ( $r = -0,59$  та  $r = -0,74$  відповідно при  $p = 0,05$ ). На нашу думку та результатами досліджень інших авторів (Bouhlef M.A., 2007), це може бути пов'язано з цитотоксичними властивостями MMP-1, яка проявляється при її надмірній кількості. Також ми не виключаємо той факт, що продукти каталізу мієлопероксидази потенціюють цитотоксичний ефект, тому не варто недооцінювати цитотоксичний ефект MMP-1. Аналіз кореляційного зв'язку між MMP-1 та p53 слабкий, але позитивний ( $r = 0,34$ ,  $p = 0,05$ ), що свідчить про запуск апоптозу клітинами при дії на них MMP-1. Ще один негативний ефект дії MMP-1 на лімфоцити В-ряду пов'язаний зі зменшенням кількості IgG та IgM, які безпосередньо продукуються цими клітинами. Цей негативний ефект створює MMP-1, що продукується епітелієм фіброзного епулісу (IgG-MMP-1  $r = -0,64$ ,  $p = 0,05$  та IgM-MMP-1  $r = -0,53$ ,  $p = 0,05$ ).

Посилення ефекту міграції клітин запального інфільтрату сприяє OPN, який продукується епітелієм фіброзного епулісу та сприяє міграції

макрофагів та нейтрофільних лейкоцитів, про що свідчать позитивні кореляційні коефіцієнти (OPN – MNO  $r = 0,25$ ,  $p = 0,05$  OPN – CD68  $r = 0,22$ ,  $p = 0,05$ ). Важливим механізмом прогресування фіброзного епулісу є проліферативна активність епітелію, що підтверджується експресією маркера проліферації Ki-67. Збільшення кількості клітин інфільтрату призводить до підвищення кількості MMP-1 та OPN епітелієм, що відобразилося у позитивному кореляційному зв'язку між Ki-67 та MMP-1, Ki-67 та OPN ( $r = 0,69$ ,  $p = 0,05$  та  $r = 0,24$ ,  $p = 0,05$ ) відповідно.

Відомо, що M2-макрофаги виконують репаративну функцію, що зумовлює проліферацію судин та фібробластів (Larsen M.S., 2012; Torabinia N.A., 2011). Результати нашого дослідження показали, що макрофаги та епітелій активно беруть участь в ангиогенезі фіброзного епулісу, про що свідчать позитивні кореляційні коефіцієнти між CD68-VEGF ( $r = 0,29$ ,  $p = 0,05$ ). Експресія VEGF епітелієм призводить до посилення росту судин і як наслідок – збільшення міграції всіх видів лейкоцитів у вогнищі ураження пародонта, це відобразилося у кореляційних зв'язках між маркерами лейкоцитів та VEGF, що експресується епітелієм (CD3-VEGF  $r = 0,43$ ,  $p = 0,05$  CD79A-VEGF  $r = 0,24$ ,  $p = 0,05$  MPO-VEGF  $r = 0,27$ ,  $p = 0,05$  CD68-VEGF  $r = 0,30$ ,  $p = 0,05$ ). Вищезазначений процес є останньою ланкою, що утворює патологічне коло та сприяє росту фіброзного епулісу (Рисунок 3).

У тканинах пародонта часто виникають вторинні зміни. При травматизації пародонта виникають крововиливи з незрілої судинної сітки, що утворюється вищезазначеним механізмом. Ці судини дуже чутливі до дії різних цитотоксичних чинників. Це підтверджується сильним позитивним кореляційним зв'язком між глікофорином еритроцитів, що накопичується під час крововиливів та MMP-1 епітелію, який здатний руйнувати колаген судин (Gli-MMP-1  $r = 0,84$ ,  $p = 0,05$ ).

На підставі проведених досліджень можна стверджувати, що фіброзний епуліс є результатом загоєння запального походження, спричиняє руйнування кістки альвеолярного відростка. При цьому ключову роль у розвитку вищезазначеного патологічного процесу відіграють макрофаги та епітелій, про що свідчать відповідні зв'язки (Рисунок 3.).

Завдяки багатьом цитогенетичним дослідженням показано, що клітини пухлин характеризуються: блокуванням апоптозу, підтримкою ангиогенезу, продукцією власних факторів росту, нечутливістю до екзогенних інгібіторів росту (Uchino K., 2015).

У наших дослідженнях встановлено, що CD68-клітини (макрофаги) відіграють ключову роль у рості гігантоклітинного епулісу, який за свого прогресування спричинює поширення резорбтивного процесу в альвеолярному відростку шелеп. За результатами досліджень та літературними даними (Aisha M.D., 2015), впевнено можна стверджувати, що CD68-позитивні багатоядерні клітини відіграють важливу роль у резорбтивному процесі. Наявність негативного кореляційного зв'язку між макрофагальними клітинами Т-, В-лімфоцитами і нейтрофільними лейкоцитами CD68-CD3  $r = -0,58$ ,  $p = 0,05$ , CD68-CD79A  $r = -0,41$ ,  $p = 0,05$ , CD68-MPO  $r = -0,50$ ,  $p = 0,05$  підтверджує вищезазначене.

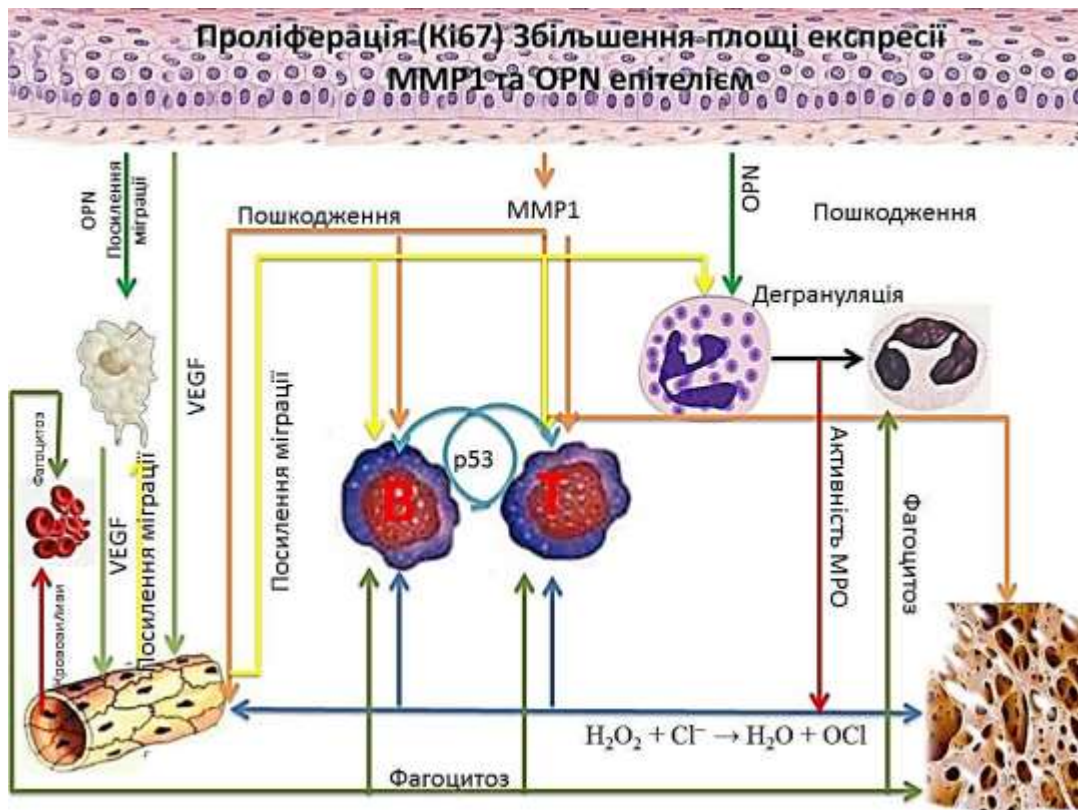


Рисунок 1.3. Схема взаємозв'язку досліджуваних маркерів у тканині фіброзного епулісу.

Не є випадковими результати наших досліджень, що довели значний позитивний кореляційний зв'язок між CD68 та OPN  $r = 0,92$ ,  $p = 0,92$  при гігантоклітинному епулісі. Цей зв'язок наводить нас на думку про остеогенне походження гігантських клітин у відповідному епулісі. Дослідженнями Ухіно К. (2015) показано, що остеобласти – клітини макрофагального ряду, які утворюють симпласти у кістковій тканині для її резорбції, – одна з стадій ремоделювання кісткової тканини. Ми вважаємо, що факт тісного зв'язку CD68-OPN частково підтверджує пухлинне походження гігантоклітинного епулісу.

Разом із тим, ми не знайшли кореляційного зв'язку між маркером проліферації Ki-67 та CD68 позитивними клітинами у гігантоклітинному епулісі  $r = 0,08$ . Цей факт наводить нас на думку, що гігантські клітини утворюються шляхом злиття. Ця гіпотеза підтверджена дослідженнями

Аіша М.Д. (2015) про утворення симпластів шляхом злиття, а не поділу клітин.

Специфіка функціонування CD68 позитивних клітин пояснюється кореляційним зв'язком (CD68 – S100  $r = 0,54$ ,  $p = 0,05$ ). Наявність позитивного кореляційного зв'язку середньої сили дозволяє стверджувати, що недостатня функціональна активність гігантських клітин макрофагального походження призводить до утворення симпластів шляхом злиття. Підтримку нашої гіпотези ми не знайшли у літературі, але цей висновок додатково підтверджується кластерним аналізом, де CD68- та S100-маркери входять до одного кластера. Той факт, що Т-клітини впливають на формування гігантоклітинних симпластів шляхом експресії регуляторних кіназ, відобразився у сучасній науці. Ми встановили, що Т-клітини є обов'язковою складовою частиною гігантоклітинного епулісу. Отже, одержані нами результати та літературні дані необхідно інтерпретувати так: слабка функціональна активність CD68 спонукає Т-клітини продукувати сигнали, що спрямовані на активне формування симпластів. На користь такої гіпотези свідчить кластерний аналіз, який дозволяє більш чітко зрозуміти етіопатогенез гігантоклітинного епулісу та показує, що до складу одного кластера увійшли CD68- та CD3-клітини.

Знижена функція макрофагальних клітин може бути обумовлена накопиченням у них значної кількості іонів  $\text{Co}^{2+}$  (до  $11,7 \pm 0,14$  %,  $P < 0,05$ ) та  $\text{Cr}^{6+}$ , а білок S100 є металопротеїном. Надмірне накопичення цих іонів здатне блокувати ензим S100, оскільки цей білок є Ca- та Zn-залежним, а ці іони заміщуються на  $\text{Co}^{2+}$  та  $\text{Cr}^{6+}$ . Поряд з цим ми спостерігали накопичення у гігантських клітинах іонів міді ( $\text{Cu}^{2+}$ ) (до  $2,61 \pm 1,3$  %,  $P > 0,05$ ) та заліза ( $\text{Fe}^{3+}$ ) (до  $6,69 \pm 0,05$  %,  $P < 0,01$ ). Серед причин, які спричинюють це явище, основну роль відіграють крововиливи, котрі стимулюють накопичення іонів заліза у гігантських клітинах, а мідь накопичується внаслідок того, що вона

грає роль каталізатора у формуванні стабільної молекули колагену, який формується в епулісах різних видів.

Ще однією патогенетичною ланкою прогресування гігантоклітинного епулісу є той факт, що збільшення кількості гігантських клітин обумовлюють зменшення експресії проапоптотичного білку p53. Це відобразилося у від'ємному слабкому кореляційному зв'язку між CD68 клітинами та білку p53  $r = -0,3$ ,  $p = 0,05$  і підтверджено кластерним аналізом. Проведена кластеризація доводить вищезазначений зв'язок. На користь цієї думки свідчать поодинокі дослідження, які показують подібний зв'язок (Rui Wang, 2014).

Ми проаналізували потенціал гігантських клітин до ангіогенезу. VEGF увійшов до сьомого фактора, що впливає на формування гігантоклітинного епулісу. На жаль, ми не виявили кореляційного зв'язку між гігантськими клітинами та судинним фактором росту. Кластерний аналіз також об'єднав фактор росту судин із клітинами В-ряду. Це дозволяє стверджувати, що у формуванні гігантоклітинного епулісу беруть участь макрофаги M1, які виконують резорбтивні функції (Notarangelo L.D., 2000). Отже, додатковим фактором, що дозволяє підтвердити вищезазначену гіпотезу, є середній позитивний кореляційний зв'язок між MMP-1 та CD68 ( $r = 0,60$ ,  $p = 0,01$ ). Значна експресія MMP-1 гігантськими клітинами пояснює морфологічну будову гігантоклітинного епулісу, а саме – крововиливи, що обумовлюють утворення гемосидерину, резорбцію альвеолярного відростка та незначну кількість колагенових структур у стромі.

Однією з імуногістохімічних ознак гігантоклітинного епулісу є значна експресія IgG та IgM. Слабкий кореляційний зв'язок ми виявили між IgM та CD68-клітинами ( $r = 0,25$ ,  $p = 0,25$ ), а його результатом імуногістохімічну експресію IgM у гігантських клітинах. У процесі розвитку запалення пародонта IgM активує комплемент 3, мішенню якого є клітини

макрофагального ряду. Клітини макрофагального ряду в нормі не експресують IgM. На нашу думку, накопичення IgM у цитоплазмі гігантських клітин при запаленні пародонта виникло внаслідок фагоциткування комплексу IgM-C3b. На цю користь свідчить кластерний аналіз, що об'єднав в один класт IgM та клітини макрофагального ряду.

Мутації у гені, що кодує ліганд CD40 (CD40 є рецептором CD154, Т-хелперних клітин), призводять до активування В-клітин для підвищеної IgM-продукції. Таким чином, мутація CD40 обумовлює підвищення кількості IgM (Lopez-Granados E., 2007). Мутація CD40 ліганду клітин спричинює активацію остеокластичної резорбції, яка спостерігається у хворих з Х-хромосомним гіпер-IgM-синдромом. Це спричинює накопичення IgM у цитоплазмі остеокластичних клітин.

Згідно з результатами нашої роботи, ми спостерігали середньої сили позитивний кореляційний зв'язок між Т-лімфоцитами та білком p53 ( $r = 0,39$ ,  $p = 0,05$ ). Природа цього явища може бути пов'язана з мутаціями, що виникають під час запальних процесів та впливі різних екзогенних чинників (Shen H., 2014). При цьому необхідно відзначити той факт, що одержаний кореляційний зв'язок служить підставою змін у Т-клітинах. Результати факторіального аналізу підтверджують цей тісний зв'язок та формують фактор 3, який зумовлює ріст гігантоклітинного епулісу. Отже, природньо виникає таке запитання: чому при великій кількості проапоптотичного білка p53 Т-клітини у процесі мутації не гинуть? На нашу думку, це відобразилося у слабкому позитивному кореляційному зв'язку між білком теплового шоку HSP90AA1 і Т-клітинами ( $r = 0,25$ ,  $p = 0,05$ ). За літературними даними, HSP90AA1 здатний стабілізувати мутагенні протеїни (Stanislawska J., 2004).

Накопичення IgG у гігантських клітинах ми не спостерігали, тому наявність позитивного середнього кореляційного зв'язку між клітинами CD79A та IgG є закономірною ( $r = 0,47$ ,  $p = 0,05$ ).



Постійна наявність білків-шаперонів у гігантських клітинах стабілізує білки і не дає розвиватися апоптотичним змінам у гігантських клітинах CD68-HSP90AA1 ( $r = 0,24$ ,  $p = 0,05$ ). Експресія HSP90AA1 у клітинах макрофагального ряду є закономірною. Наявність HSP90AA1 у клітинах макрофагального ряду спрямована на захист поліпептидного ланцюга при фагоцитованні та представленні антигена (Paere B., 2009; Wang F.Q., 2013).

Важливу роль у формуванні гігантоклітинного епулісу відіграє епітелій, що покриває його поверхню. Ми зазначали раніше, що при запаленні пародонта та при розвитку гігантоклітинного епулісу існує зв'язок між епітеліальними білками MMP-1 та OPN ( $r = 0,59$ ,  $p = 0,05$ ), які потенціюють крововиливи та посилюють міграцію лейкоцитів.

Звертаємо увагу, що гранулоцитарні лейкоцити у ділянках запалення пародонта викликають негативні зміни у кістковій тканині та судинах. Це пошкодження зумовлене дією продуктів каталізу MPO, що знайшло своє віддзеркалення у негативному коефіцієнті кореляції між білками MPO та CD68 ( $r = -0,50$ ,  $p = 0,05$ ). Отже, у гігантоклітинному епулісі продукти каталізу мієлопероксидази призводять до зменшення кількості клітин макрофагального ряду.

За результатами викладеного матеріалу ми пропонуємо схему формування гігантоклітинного епулісу з урахуванням вищезазначених зв'язків (Рисунок 4).

Дослідження ангіоматозного епулісу, який ми вивчали за допомогою стандартного забарвлення гематоксилін-еозином та імуногістохімічним методом із використанням антитіл до VEGF, показало великий потенціал клітин інфільтрату до ангіогенезу. Встановлено, що клітини макрофагального ряду (CD68) продукують VEGF, про що свідчить позитивний кореляційний зв'язок ( $r = 0,37$ ,  $p = 0,05$ ). Ми також спостерігали негативний кореляційний зв'язок між S100 та VEGF, тобто чим більший активний ангіогенез, тим

менша активність макрофагальних клітин, про що свідчив кореляційний графік ( $r = -0,42$ ,  $p = 0,05$ ). Разом з тим макрофаги M2-типу активно беруть участь у формуванні гемангіом, що було доведено у дослідженнях Венгу Ф. (2013). Крім того, дослідники показали зв'язок між ангиогенезом та кількістю макрофагів у гемангіомі.

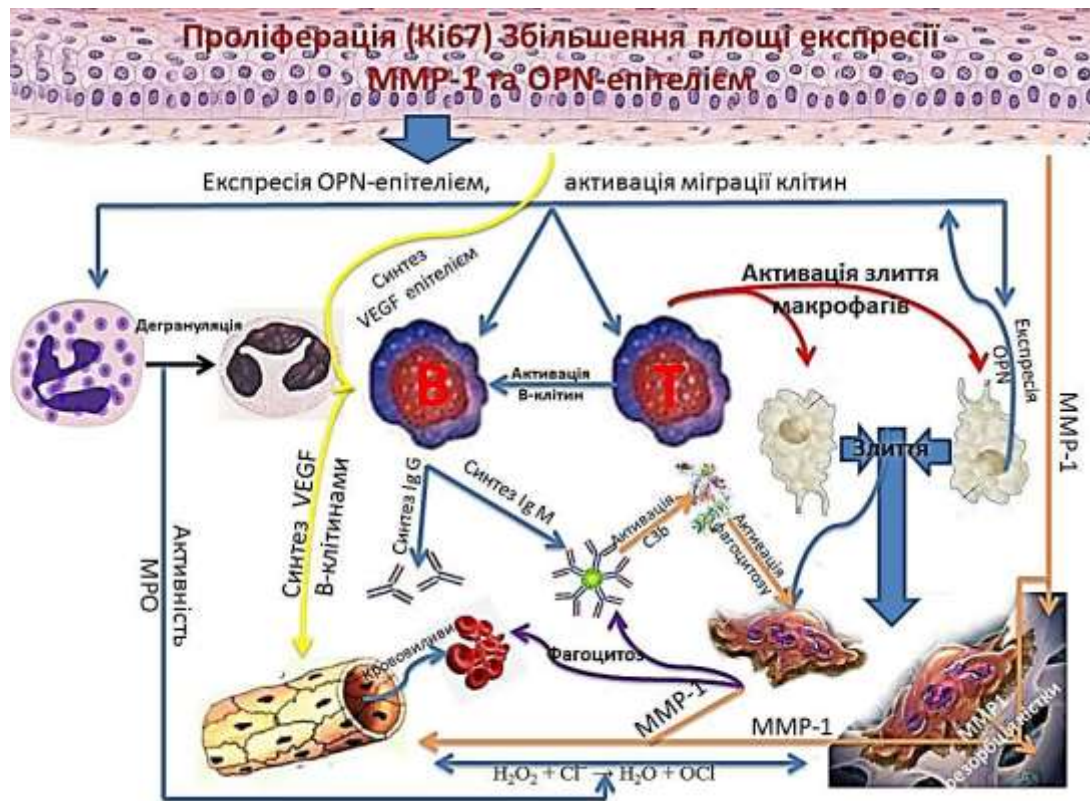


Рисунок 1. 4. Схема взаємозв'язку досліджуваних маркерів у морфогенезі гігантоклітинного епулісу.

При запаленні пародонта ми встановили слабкий позитивний кореляційний зв'язок між проліферативним пептидом Ki-67 та VEGF ( $r = 0,24$ ,  $p = 0,05$ ), що підтверджує проліферацію судин у вогнищі формування ангиоматозного епулісу. Необхідно відмітити той факт, що стимуляція росту судин сприяє папіломовірусній інфекції (Wieczorek E., 2015).

Антиангіогенетичну дію на судини спричиняє MMP-1, який руйнує колаген судин. Це відобразилося у негативному коефіцієнті кореляції середньої сили між MMP-1 та VEGF ( $r = -0,51$ ,  $p = 0,05$ ), що збігається з літературними даними, які відзначають негативний кореляційний зв'язок між металопротеїназною активністю та процесом пухлинного росту і метастазуванням (Lee K.M., 2013). Судинний фактор росту, що залучений у ангіогенез, також активує нейтрофіли при запаленні. Підвищена кількість нейтрофілів збільшує секрецію металопротеїназ (Flegel W.A., 2015). Ми також спостерігали закономірність, яка у нашому випадку підтвердилася у позитивному кореляційному зв'язку середньої сили між гранулоцитарними лейкоцитами (MPO) та MMP-1 ( $r = 0,51$ ,  $p = 0,05$ ).

Необхідно звернути особливу увагу на те, що значна кількість еритроцитів та гемосидерину, які знаходилися у міжсудинному та міжкавернозному просторі, обумовлена дією MMP-1 на судини. Глікофорин (Gly), який міститься в еритроцитах, мав слабкий позитивний кореляційний зв'язок з VEGF ( $r = 0,21$ ,  $p = 0,05$ ). Цей зв'язок обумовлений вищезазначеним патогенезом. Необхідно врахувати, що ми спостерігали сильний позитивний кореляційний зв'язок глікофорину та IgG ( $r = 0,7$ ,  $p = 0,05$ ) і слабкий позитивний кореляційний зв'язок глікофорину та IgM ( $r = 0,21$ ,  $p = 0,05$ ). Відомо, що імуноглобуліни беруть активну участь у гемолізі еритроцитів (Alzate M.A., 2015; Hamaova M., 2015). За безпосередньої участі C3b, IgG та IgM стимулюється процес фагоцитування еритроцитів, що містяться у міжсудинних просторах ангіоматозного епулісу (Romano S., 2015). Т-хелперні клітини у вогнищі запалення здійснюють контроль за кількістю В-клітин та продукцією ними антитіл, кількістю нейтрофілів та макрофагів (Dumitriu I.E., 2015). Ми спостерігали слабкий позитивний кореляційний зв'язок ( $r = 0,29$ ,  $p = 0,05$ ) між Т-клітинами та В-клітинами; Т-клітинами та гранулоцитарними лейкоцитами ( $r = 0,25$ ,  $p = 0,05$ ). Разом із тим відзначається сильний негативний кореляційний зв'язок між Т-клітинами та

макрофагами (r = -0,69, p = 0,05). Таким чином, вищезазначені кореляційні зв'язки доводять Т-клітинну регуляторну функцію у ангиоматозному епулісі (Щипский А.В., 2008). Ендотелій судин продукує OPN у незначній кількості та відповідно сприяє міграції як самих ендотеліальних клітин, так і клітин крові, що доведено слабким позитивним кореляційним зв'язком (r = 0,21, p = 0,05).

За результатами досліджень ми запропонували схему формування ангиоматозного епулісу з урахуванням вищезазначених зв'язків (Рисунок 5).

У роботі ми визначали експресію MGMT на рівні білка, а також визначали кількість MGMT-позитивних клітин імуногістохімічно та за допомогою Вестерн-блот аналізу.

Дані білкового аналізу показують, що епуліси та запальні процеси пародонта характеризуються генетичною нестабільністю. Під впливом різних факторів (мікроорганізмів, дії солей важких металів та ін.) у клітинах епулісів та пародонті часто виникають пошкодження ДНК і зміни експресії різних генів, відповідно змінюється і перебіг захворювання. Підтвердженням цього є результати дослідження епулісної тканини на важливий білок-онкосупресор – p53. Неоднорідність відсотка ядер із позитивною реакцією, переважно низька та помірна експресія p53, свідчать про часту інактивацію цього гена при ушкодженні пародонтальних клітин. У цілому в епулісах і тканинах пародонта характерна наявність MGMT. При цьому для рецидивів епулісів на фоні гормональних змін характерні більш високі рівні MGMT, ніж для первинних пухлин. Ми пов'язуємо такі результати з тим, що пацієнти з рецидивами епулісів мають значні гормональні зміни в організмі, свідченням чого є гіпертрофічні прояви у яснах вагітних, яких ми спостерігали.

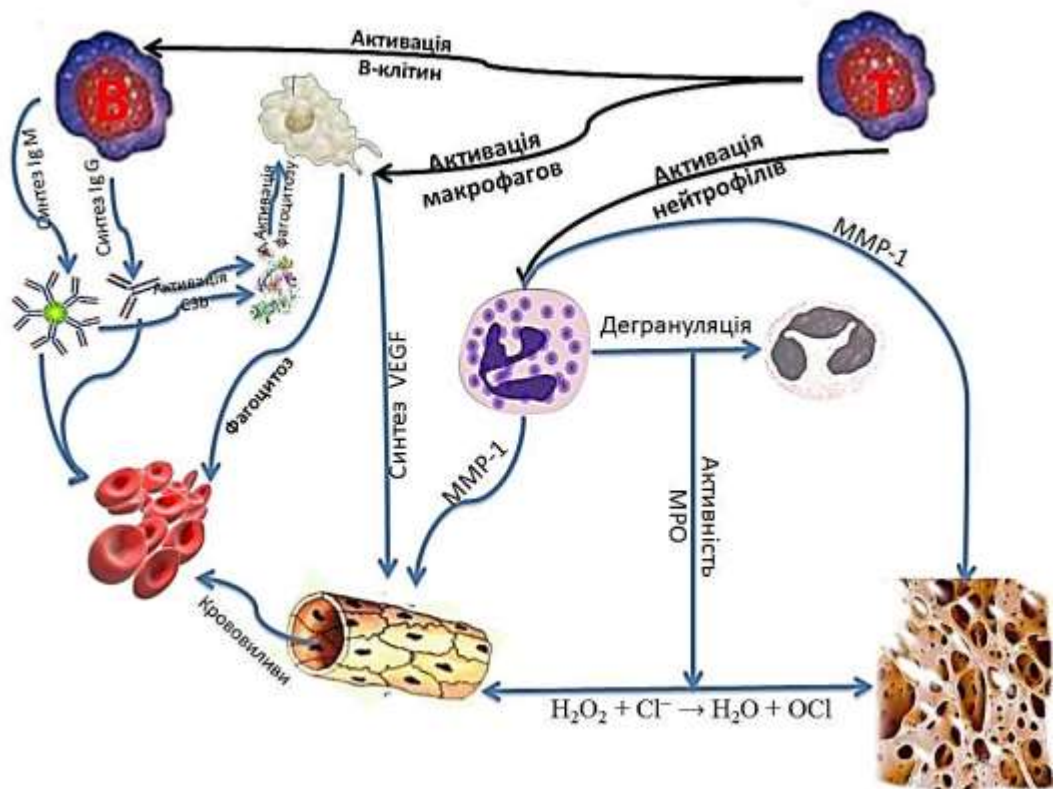


Рисунок 1.5. Схема взаємозв'язку досліджуваних маркерів в ангіоматозному епулісі.

У більшості зразків нормальної тканини пародонта ензим міститься у помірній кількості. Оцінюючи результати, можна припустити, що при трансформації пародонтальних клітин відбувається зміна експресії гена *MGMT*. Саме тому в епулісах ми спостерігали різні рівні *MGMT*. У середньому відсоток *MGMT*-позитивних клітин в епулісах був такими:  $(15,05 \pm 6,22) \%$  – фіброзний;  $(74,32 \pm 2,7) \%$  – гігантоклітинний;  $(51,12 \pm 21,63) \%$  – ангіоматозний епуліси. Тобто *MGMT* забезпечує стійкість до алкілувальних речовин, а різні рівні *MGMT* свідчать про різний етіопатогенез епулісів. Ангіоматозний епуліс характеризується більш частими рецидивами (Liu L., 1996). Можливо, при незначній кількості ензиму клітини стають більш чутливими до ендо- та екзогенних алкілувальних речовин.

Такі неоднозначні результати можуть пояснюватися патогенетичними змінами у різних клітинах через стрес під час хронічного запалення пародонта. Тобто різний ступінь активності у клітинах спричинює розвиток різних видів епулісів, хоча ряд ензимів здатні виконувати функцію *MGMT*. Ці ензими (*hMSH2*, *hMLH1*, *hPMS1*, *hPMS2*) діють каскадом і замінюють тимін у парах Об-метилгуанін-тимін на цитозин. Високий рівень ензимів системи помилкового спарювання робить клітину нечутливою до алкілувальних речовин навіть за відсутності у ній *MGMT* (Grafstrom R.C., 1984).

Ми проаналізували пари зразків «нормальна тканина» – «тканина пацієнтів з запаленням», «нормальна тканина» – «різні види епулісів» на кількість *MGMT* методом Вестерн-блот аналізу. У результаті було підтверджено наявність зв'язку між морфогенезом пародонтиту та наявністю *MGMT* у клітинах пародонта.

Рівень експресії *MGMT* у 12 зразках гігантоклітинного епулісу характеризувався неоднорідністю поблизу зони інтактної тканини пародонта. Належність останніх до «нормальної тканини» підтверджена гістологічними дослідженнями. Ми не знайшли статистично достовірної кореляції між кількістю ензиму *MGMT* у ділянках нормальної тканини пародонта та гігантоклітинного епулісу за допомогою імуногістохімічного дослідження. Ми встановили позитивну кореляцію між кількістю *MGMT* та p53 у гігантоклітинному та фіброзному епулісах ( $r = 0,30$ ,  $P \leq 0,05$ ,  $r = 0,21$ ,  $P \leq 0,05$  відповідно). Тобто, чим більше *MGMT*, тим більше p53.

За літературними даними, для різних типів клітин характерні свої особливості експресії *MGMT* (Loire R., 1991), тому важливо було порівняти результати досліджень експресії *MGMT* у різних клітинах пародонта. За такий матеріал ми обрали кісткову, епітеліальну, фіброзну тканини пародонта у нормі та при запаленні. У літературі ми не знайшли інформацію про експресію *MGMT* у тканинах пародонта.

Питання гістогенезу епулісів на сьогодні залишається суперечливим. Існує дві теорії – пухлинна та запальна. Морфологічно неможливо підтвердити жодну з них. Для прикладу, гігантоклітинний епуліс має структурні ознаки як пухлини, так і запальної гігантоклітинної гранулеми. Ангіоматозний епуліс має ознаки гемангіоми, молоді незрілої грануляційної тканини та ознаки пухлини мезенхімального походження, з клітин ендотелію судин. Фіброзний епуліс часто проявляє ознаки фіброми або грануляційної тканини у стадії організації. Ми провели імуногістохімічне дослідження ангіоматозного епулісу на предмет експресії E-кадгерину, щоб перевірити можливість гістогенезу з ендотелію судин цього патологічного процесу в пародонті. E-кадгерин – епітеліальний фактор адгезії, який наявний на мембранах лише епітеліальних клітин. Усі зрізи ангіоматозного епулісу, які ми дослідили виявилися імунонегативними. При цьому інші дослідники стверджують, що ендотеліальні маркери (E-кадгерин FVII-R-Ag, CD31, CD34, алкалін-фосфатаза) виявляються у більшості клітин ендотелію та капілярних синусоїдів пухлин з ендотеліальним компонентом (Curschellas E., 1991; Farrel D.J., 1996). Виходячи з вищезазначеного, ми вважаємо можливим стверджувати, що при зміні мікрооточення ушкодженого пародонта ангіоматозним епулісом подальше диференціювання клітини може призвести до зміни імунологічного профілю тканин пародонта.

Для ангіоматозного епулісу, як і для фіброзного та гігантоклітинного, характерний широкий діапазон кількості клітин з MGMT-реакцією. Середній відсоток ядер із позитивною реакцією та інтенсивністю забарвлення зайняв проміжне положення між MGMT позитивними клітинами фіброзного та гігантоклітинного епулісів ( $51,12 \pm 21,63$ ) % проти ( $15,05 \pm 6,22$ ) % та ( $74,32 \pm 2,70$ ) %, відповідно. Вестерн-блот аналіз також підтвердив цю різницю. Тобто при трансформації тканин пародонта в ангіоматозному епулісі спостерігаються істотні зміни експресії MGMT, хоча наявність

ензиму в ендотелії судин спостерігається частіше, ніж у клітинах мікрооточення гігантоклітинного та фіброзного епулісів.

Ми встановили статистично достовірну негативну кореляцію між кількістю MGMT та p53 в ангіоматозному епулісі ( $r = -0,69$ ,  $p \leq 0,05$ ). Отже, чим більше ензиму MGMT у клітинах ангіоматозного епулісу, тим менше p53, що, на нашу думку, є фактором прогресування патологічного процесу в епулісі.

На цей час механізми регуляції функції гена *MGMT* недостатньо вивчені. Найбільше відомі епігенетична (метилування промотора гена) та зворотня (за допомогою білка p53) регуляції. Менше вивчена індукція MGMT під впливом глюкокортикоїдних гормонів через глюкокортикоїд – розпізнавальну ділянку промотора (Biswas T., 1999). Недостатньо вивчені механізми регуляції. Також недостатньо уваги приділялося рівню MGMT у різних клітинах організму. Дослідники вважали, що їх немає. У нашій роботі була показана наявність таких зв'язків у пухлинних клітинах, за відсутності їх у нормальних. За одержаними результатами ми запропонували гіпотезу морфогенезу ушкодження пародонта при запаленні.

Можливо, не рівень MGMT у тканинах пародонта при запаленні впливає на утворення епулісів різних видів, а рівень MGMT у запальному інфільтраті при запаленні призводить до утворення епулісів. Припустимо, що в організмі існує зв'язок між рівнем MGMT у різних клітинах. Його зміни добре простежуються на прикладі лейкоцитів. Ці клітини є зрілими формами швидкооновлюваної гемопоетичної тканини і тому першими відображають зміни в організмі. Якщо загальний рівень MGMT низький, в організмі підвищується ризик виникнення мутацій і з рештою – онкогенної трансформації клітин. Чим менше у клітинах MGMT, тим більшу кількість метильних радикалів буде приєднано до нуклеотидів і тим більше, з рештою, мутацій буде у ДНК клітин. Для підтвердження цієї гіпотези ми



проаналізували ДНК лейкоцитів крові, тканин пародонта та внутрішніх органів тварин із хромовим мікроелементозом та встановили різний ступінь фрагментації ДНК у різних органах та тканинах під впливом іонів  $\text{Cr}^{6+}$ . Хром безпосередньо та опосередковано (через блокування репаративних систем) призводить до утворення розривів ДНК. Найбільші пошкодження ДНК спостерігались у клітинах селезінки, кісткової тканини та пародонта.

Клітини доброякісних пухлин за своїми морфологічними і біохімічними характеристиками незначно відрізняються від нормальних клітин-попередників. Клітини злоякісних пухлин фенотипічно змінюються настільки, що, іноді, встановити їх походження можна лише за допомогою морфологічних досліджень. Імовірно, що кількість мутацій у пухлинній клітині пропорційна рівню *MGMT* у ній і ступеню зміни її фенотипу.

Якщо ці мутації спостерігаються у лейкоцитах та містяться у функціонально неважливих ділянках геному і пошкоджують малі його ділянки, то при трансформації клітина змінюється незначно і дає початок гігантоклітинному епулісу.

Мутація може відбутися у ділянках геному ендотелію судин та фібробластів і змінити фенотип цих клітини. Так виникають клітини, що дають початок ангіоматозному або фіброзному епулісу.

Ці нечисленні зміни з високою ймовірністю можуть не торкатися структури гена *MGMT* і тому його експресія не змінюватиметься. Тому у відповідь на мутації відбувається підвищення експресії репаративних ензимів. Множинні мутації прямо та опосередковано через активацію транскрипційних факторів *c-fos*, *c-jun*, *junB*, *junD* та *AP-1* (активаторний протеїн-1) індукують експресію *MGMT*. Усі перелічені транскрипційні фактори активуються під дією мутацій і спричинюють гіперекспресію *MGMT* (Dosch J., 1999).

Первинним пусковим механізмом росту епулісу може бути інактиваторна мутація гена *MGMT*. Найчастіше це гіперметилування промотору гена або делеція. Мутації генів із заміною нуклеотидів трапляються досить часто. Недостатність репаративної системи призводить до підвищення частоти мутацій, їх накопичення, істотної зміни генної функції і морфології клітини. Таким чином, виникає, на нашу думку, фіброзний та ангіоматозний епуліси.

Для цього варіанту росту епулісів, на відміну від попереднього, первинним дефектом є мутація саме у структурі репаративних ензимів фібробластів та ендотелію судин, що призводить до їх інактивації. В іншому разі, при виникненні мутацій у регуляторних генах, останні будуть усунуті і подальшого каскаду змін структури ДНК просто не відбудеться. За недостатності репаративних систем клітини у ній виникають нові мутації у протоонкогенах і самих репаративних генах. Ступінь метилування промотора *MGMT* корелює з рівнем мРНК-транскриптів (Morandi L., 2010), тому наступні мутації у структурі гена ще більше пригнічують його функцію.

Разом із тим, у епулісах різних видів через особливості метаболізму (переважно анаеробне дихання, перекисне окислення ліпідів) підвищується рівень ендогенних металопротеїназ, що спричиняє резорбтивні зміни в альвеолярному відростку щелеп та некроз клітин. Такі процеси спостерігаються постійно через невідповідність швидкості росту кістки і дії на неї протеаз. Це призводить до зростання експресії *MGMT* за принципом прямої індукції з подальшим її виснаженням. Так пояснюється низький рівень чи відсутність *MGMT* у клітинах кісткової тканини при запаленні пародонта та різних типах епулісів.

Звичайно, ми порівняли результати експресії *HSP90aa1* з наявністю у зразках епулісів *MGMT*. Ми не виявили залежності між рівнем *MGMT* в епулісах та *HSP90aa1* мікрооточення. Цікаво, що між *HSP90aa1*, який

експресується епітелієм та MGMT-строми фіброзного епулісу, така залежність наявна на рівні ( $r = -0,48$ ,  $P \leq 0,05$ ). Тобто, у патогенезі фіброзного епулісу важливу роль відіграє епітелій. Стан епітелію та рівень експресії різних ензимів сильно залежить від мікрофлори порожнини рота. Відсутність кореляції між MGMT та HSP90aa1 мікрооточення епулісів на цій вибірці доводить, що не гістологічний тип епулісу, а саме його генетичні та біохімічні особливості відіграють визначальну роль у морфогенезі та патогенезі епулісів.

Результати культуральних досліджень на стандартних клітинних лініях та фібробластах *in vitro* показали, що обидві клітинні лінії, які ми досліджували, чутливі до дії алкілувальних речовин, і під впливом інгібітора активності MGMT Об-бензилгуаніну стають ще більш чутливими. Клітинна лінія U373 не має MGMT. Порівняно з фібробластами, що має MGMT, вона більш чутлива до цитотоксичної дії алкілувальних сполук, які продукують мікроорганізми.

Цитотоксична метилувальна речовина MNNG спричинює подібні зміни у культурі клітин, як і токсини бактерій. Збільшення кількості мертвих клітин свідчить про нездатність репаративних систем клітин усунути пошкодження ДНК. Це відображається у перебігу агресивного генералізованого пародонтиту, коли лікарі-клініцисти говорять про досить малий інтервал між початком запального процесу та повною втратою зубів.

Це пов'язано з тим, що високі дози алкілувальних сполук, які виробляють бактерії пародонтальних карманів, виснажують запаси MGMT, яка, як відомо, не здатна реактивуватися знову. Коли весь MGMT у клітині вичерпано, а алкілувальної речовини багато, нові пошкодження ДНК не відновлюються і клітина гине. Цим пояснюється незначна дія бактеріальних алкілувальних токсинів. Вони є дуже сильними алкіляторами, тому спричинюють значні пошкодження ДНК у тканинах пародонта. Цих

пошкоджень так багато, що MGMT-клітин, як правило, не вистачає для повного їх усунення.

Про існування такої концепції свідчить відсутність зв'язку між MGMT-та HSP90aa1-молекулами ензиму. MGMT не відновлюються шаперонами, що додатково кумулює метилувальний ефект. У цьому випадку зростає кількість пошкоджень ДНК. Таким чином, вичерпання усіх запасів MGMT погіршує перебіг пародонтиту.

Наші експерименти показали, що мікроорганізми пародонтальних карманів мають цитотоксичну дію на клітини. Це пов'язано з наявністю бензольного кільця у структурі інгібітора активності MGMT соматичних клітин. Циклічні сполуки (наприклад, аліфатичні аміни) є більш сильними мутагенами (Miller E.C., 1978). Алкілувальні сполуки постійно виробляються у бактеріальних клітинах, тому у бактерій є подібні до MGMT репаративні системи, що мають певну ферментативну активність до видалення метильних і алкільних радикалів. Наприклад, гомологічні білки *Escherichia coli* *ada* і *org* з різною специфічністю здатні видаляти метильні та алкільні групи від різних нуклеотидів ДНК-бактерій (Harris L.C., 1993).

Вони здатні ковалентно зв'язуватися з нуклеотидами і вбудовуватися між ними у дочірньому ланцюзі під час реплікації. Це спричинює зсув рамки зчитування. Такі мутації здатні спричинити інактивацію гена і відігравати важливу роль у механізмах канцерогенезу (Ames B., 1973). Звичайно, виникнення таких мутацій може активувати системи апоптозу, які ми і спостерігали під час запалення пародонта.

Під час дослідження зразків пухлин різного генезу підтверджено, що низькі рівні MGMT поєднуються з численними транзиціями генів *p53* (Osanaï T., 2005), *K-ras* (Jackson P.E., 1997; Povey A.C., 2002), APC і  $\beta$ -катеніну (Halford S., 2005). Не завжди є подібна кореляція, через те, що MGMT все-таки не єдиний механізм захисту геному від мутагенного ефекту

алкілувальних сполук (Lees N.P., 2004). Важливим фактором регуляції експресії *MGMT* є гіперметилування промоторної ділянки гена, за якої спостерігається повна відсутність його експресії. Вона робить клітину надзвичайно чутливою до згубних ефектів алкілувальних речовин і часто трапляється у пухлинних клітинах. При гіперметилуванні промотору *MGMT* збільшується кількість мутацій у генах-онкосупресорах (Esteller M., 2000, 2001). Відомий зв'язок однонуклеотидного поліморфізму в структурі гена *MGMT*, транзицій у генах *p53* і *K-ras* з підвищеним ризиком розвитку раку легень у курців (Zhong Y., 2010). У пухлинах астроцитарного походження часто трапляються супресорні мутації гена *TP53* з великою кількістю транзицій типу G:C→A:T у його структурі. У двох третинах випадків такі мутації поєднані з гіперметилуванням промотору гена *MGMT* (Karga H., 2000). Аналогічні дослідження проводили на зразках міксом серця. Вивчали експресію генів *TP53*, *K-ras*, *Bcl-2* і виявили лише гіперекспресію *K-ras* (Suvarna S.K., 1996).

Таким чином, бензольне кільце, яке є у продуктах метаболізму бактерій, призводить до виснаження репаративних систем клітин пародонта. Через інактивацію *MGMT*-клітини інфільтрату, фібробласти, ендотеліоцити стають більш чутливими до дії алкілувальних сполук із подальшим метилуванням ДНК. Тому репаративний ензим *MGMT* відіграє ключову роль у резистентності клітин пародонта до дії алкілувальних сполук бактерій.

На підставі вищезазначеного запропонована схема патогенетичного походження різних типів епулісів та перебігу пародонтиту при дії алкілувальних речовин на фібробласти, лейкоцити, ендотеліоцити тканин пародонта (Рисунок 6).

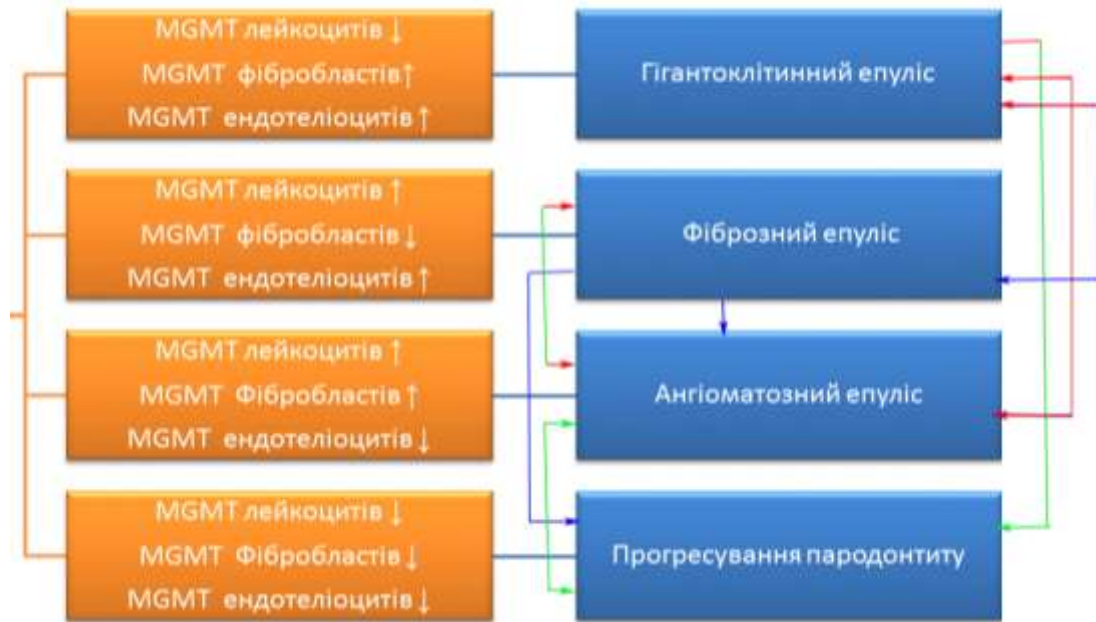


Рисунок 1.6. Схема морфологічних взаємозв'язків типів епулісу та перебігу пародонтиту.

## 1.2 Морфологічні особливості папілярного раку щитоподібної залози з біомінералізацією

За останні роки рівень захворюваності на РЩЗ в Сумській області вийшов на перші позиції в Україні, підвищуючи рівень онкологічної патології у загальнодержавному масштабі. Показники захворюваності на РЩЗ в Сумській області досягли рівня США, які є одними з світових лідерів у розповсюдженні даної патології. Так, в США захворюваність на РЩЗ в 2012 р. становила 14,9 на 100 тис. населення, в Україні – коливалась в межах 6,6 (2012 р.) – 7,5 (2013 р.) – 6,8 (2014 р.) на 100 тис. населення, на Сумщині – зростала з 10,3 (2012 р.) та 11,2 (2013 р.) до 15,1 (2014 р.) на 100 тис. населення (Рисунок 1).

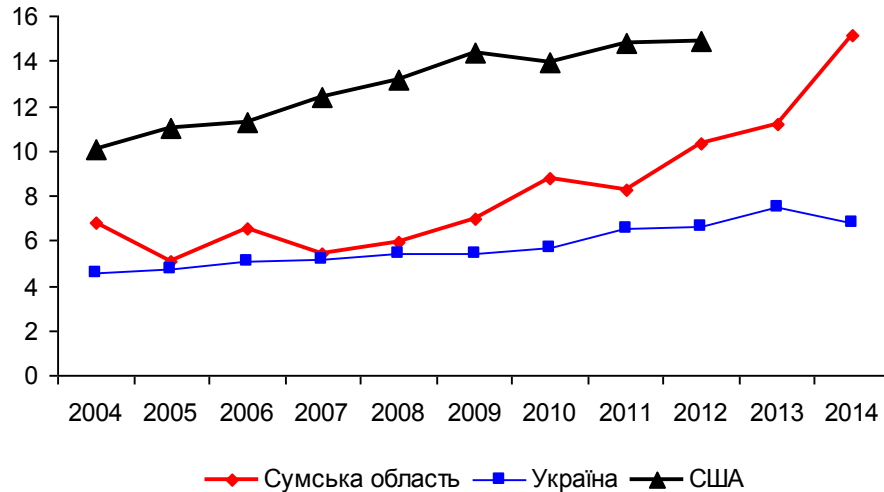


Рисунок 2.1. Порівняння захворюваності на злоякісні новоутворення ЩЗ в Сумській області, Україні та США. Для Сумської області та України дані 2004–2014 років, США – дані 2004–2012 років.

За результатами численних досліджень, найбільшу питому частку (70–80%) має ПРЩЗ, при чому епідеміологічна картина відповідає більшості регіонів світу. Не виключенням є північно-східний регіон України. Так, в Сумській області серед усіх гістологічних типів РЩЗ значну перевагу має ПРЩЗ, питома частка якого коливалася впродовж періоду спостереження 2004–2014 років від 70,37% до 81,75% від загальної кількості (Рисунок 2).

Як показали спостереження впродовж 2004–2014 років, на території Сумської області майже  $\frac{3}{4}$  кількості пацієнтів (74,0%) зі злоякісними пухлинами ЩЗ хворіють на ПРЩЗ. Це підтверджує надзвичайну епідеміологічну та соціально-економічну важливість проблеми ПРЩЗ та необхідність більш глибокого дослідження механізмів його виникнення, розвитку та лікувального патоморфозу.

Клініко-морфологічне дослідження матеріалу пацієнтів I групи з ПРЩЗ, у яких були виявлені ознаки патологічної біомінералізації показало, що співвідношення чоловіків і жінок складало 1:9 (3 чоловіків та 27 жінок), їх

середній вік становив  $56,93 \pm 2,18$  років. У II групі хворих ПРЦЗ (контрольна група, без ознак мінералізації) співвідношення чоловіків і жінок відповідало 1:4 (6 чоловіків та 24 жінок), середній вік склав  $52,03 \pm 2,02$  року. При порівнянні вікових показників двох досліджуваних груп достовірної різниці не було виявлено ( $p > 0,05$ ). Таким чином, присутність явищ біомінералізації у хворих на ПРЦЗ не залежить від віку пацієнтів.

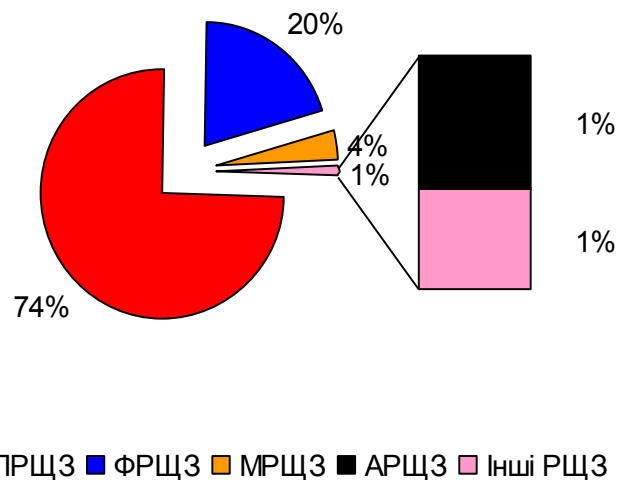


Рисунок 2.2. Питома частка гістологічних типів РЦЗ впродовж 2004–2014 рр. ПРЦЗ – папілярний рак, ФРЦЗ – фолікулярний рак, МРЦЗ – медулярний рак, АРЦЗ – анапластичний рак.

При макроскопічному дослідженні препаратів I групи, було встановлено, що максимальний розмір пухлинного вузла в середньому становив  $1,84 \pm 0,13$  см, а в групі пацієнтів ПРЦЗ без біомінералізації цей показник становив  $1,44 \pm 0,09$  см ( $p < 0,07$ ). В обох групах пацієнтів у частині випадків (7 – I група, 8 – II група) були виявлені метастази у лімфатичні вузли шиї. Це дозволило сформувати додаткові групи порівняння для оцінки можливого зв'язку або впливу між біомінералізацією та метастазуванням. За умов наявності метастазів у пацієнтів I групи максимальний розмір первинної



«мінералізованої» пухлини у середньому складав  $2,09 \pm 0,2$  см, цей же показник у пацієнтів II групи з «м'якими» пухлинами відповідав  $1,31 \pm 0,17$  см. Порівнюючи випадки з метастазами в обох групах, було виявлено, що за умов наявності патологічної біомінералізації у хворих розмір пухлини був достовірно більший, ніж при її відсутності ( $p < 0,02$ ).

При аналізі випадків ПРЦЗ без метастазування не виявлено різниці між розмірами пухлин за наявності (група I) та відсутності (група II) кальцифікатів.

Отже, у випадку наявності метастатичного процесу (верифікованими метастазами в лімфатичні вузли ший), відмічається зв'язок біомінералізації з величиною первинної пухлини: «мінералізовані» новоутворення мають більші розміри. Більшість випадків ПРЦЗ характеризувалася млявим перебігом і повільним ростом, тому розмір пухлини може слугувати певним хронологічним маркером. Процеси утворення біомінералів сполук кальцію також потребують певного часу для розвитку. Наявність зв'язку між розміром пухлини та біомінералізацією, очевидно, пояснюється тим, що більша за розміром пухлина, як правило, довше існує, а кальцифікація потребує часу для розвитку. Схоже на те, що наявність біомінералізації відтерміновує появу метастазів. Отже, думка про біомінералізацію у ЩЗ як активного процесу, котрий стримує ріст і поширення пухлинних клітин, має певне підтвердження в результатах нашого дослідження.

Обидві досліджувані групи були порівняні за якісним гістологічним складом ПРЦЗ. У пацієнтів I групи було діагностовано наступні гістологічні варіанти ПРЦЗ: 22 випадки класичного варіанту ПРЦЗ, 3 випадки дифузно-склеротичного варіанту ПРЦЗ, по 2 випадки фолікулярного варіанту ПРЦЗ та висококлітинного варіанту ПРЦЗ і 1 випадок солідного варіанту ПРЦЗ. Більшість пацієнтів II групи мали класичний гістологічний варіант ПРЦЗ (24

особи), інші варіанти представлені 5 випадками фолікулярного варіанту ПРЦЗ і 1 – висококлітинного варіанту ПРЦЗ.

При співставленні гістологічного типу ПРЦЗ і проявів біомінералізації, можна зробити висновок про відсутність чіткого зв'язку між цими показниками. Виключення становить лише дифузно-склеротичний варіант ПРЦЗ, усі випадки якого супроводжувалися відкладенням мінеральної речовини у вигляді ПТ. Це може свідчити про зв'язок між розвитком сполучної тканини у пухлині і відкладенням мінеральних сполук кальцію. Проте, вирішення питання, який процес є первинним, а який – вторинним, потребує подальших досліджень.

Дослідження патогенетичних особливостей біомінералізації на фоні перебігу ПРЦЗ накопичує все більше фактів не тільки про те, що цей процес є за своєю сутністю захисним (компенсаторно-приспосувальним), але й те, що цей процес є активним (з боку організму).

У групі зразків ПРЦЗ з біомінералізацією у 80% випадків виявлялися ПТ, тому це питання буде висвітлене більш детально. Важливо відмітити різницю між ПТ і калькосферолітами, які мають округлу форму і складаються зі сполук кальцію, але перші завжди мають ламелярну (шарувату) структуру, другі – ні (Рисунок 3).

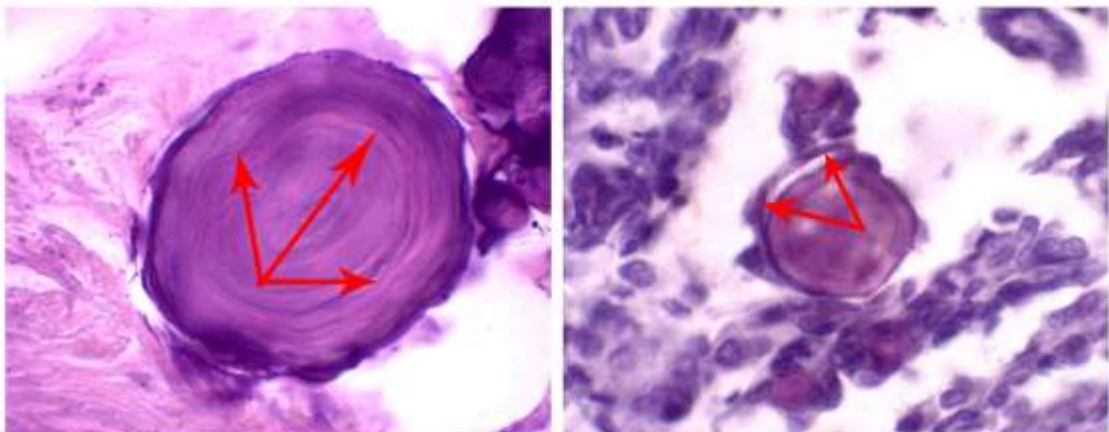


Рисунок 2.3. Псамомні тільця. А. ПТ з чіткою ламелярною структурою; Б. ПТ оточене помітними залишками судинної стінки. Забарвлення гематоксилін-еозином. Збільшення  $\times 400$ .

Серед 24 пацієнтів з виявленими ПТ, їх кількість у кожному випадку варіювала від одного до кількох десятків. Величина діаметра ПТ варіювала від 39,79 до 181,87 мкм. ПТ за величиною можна розділити на 3 групи: малі (40–60 мкм), середні (61–100 мкм) та великі (101–200 мкм і більше). У великих та частково середніх (в залежності від якості мікропрепарату) ПТ представлялося можливим провести вимірювання товщини шару (ламели) у ПТ. Вона коливалася від 3,5 до 9,3 мкм. За нашими результатами існування ПТ нерозривно пов'язане з судинами різного калібру. Саме прикріплення пухлинного емболу до стінки судини та послідуєча загибель ракових клітин дає початок ПТ. У цьому разі величина діаметру судини обумовлює величину діаметру і форму ПТ. Фактично, ПТ є кальцифікованою «пробкою» овальної, циліндричної або сферичної форми, яка призводить до запустіння (виведення з ладу, загибелі) судини і дегенерації пухлинного сосочка. У цьому факті логічно можна вбачати протидію організму поширенню злоякісних пухлинних клітин за допомогою процесів біомінералізації. Це підтверджується нещодавніми дослідженнями, за якими пухлини з інтенсивним кровопостачанням статистично частіше мають більший розмір, ніж пухлини зі зниженим кровопостачанням.

Для верифікації вмісту сполук кальцію у ПТ було використано забарвлення парафінових зрізів алізариним червоним S. Цей барвник цінний також тим, що використовується для спектрофотометричного визначення іонів  $\text{Ca}^{2+}$  та деяких інших двохвалентних металів. Іншими словами, інтенсивність забарвлення алізариним червоним S прямо пропорційна кількісному вмісту іонів  $\text{Ca}^{2+}$ .

У ході забарвлення зрізів мінералізованих ПРЦЗ нами було помічено «ореол» або «гало» навколо ПТ барвника меншої інтенсивності забарвлення, ніж основне тіло ПТ. Дифузія барвника навколо ПТ відносно нерівномірна, але коливається у відносно вузьких межах і має направлене відцентрове поширення в усі сторони (в середньому складаючи  $7,89 \pm 0,59$  мкм) (Рисунок 4).

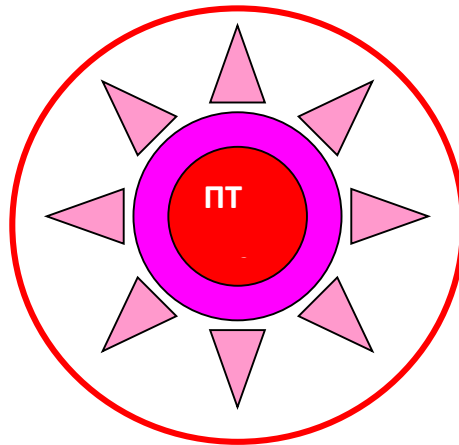


Рисунок 2.4. Схема дифузії іонів  $\text{Ca}^{2+}$  з ПТ в оточуючі тканини. Червоне ядро з бузковим обідком – ПТ, трикутники показують напрям дифузії, червоним колом обмежена зона дифузії.

ПТ є доволі дослідженим об'єктом, проте за допомогою оригінальної методики нам вдалося більш точно встановити тип кальцієвої сполуки, з якої вони складаються. СЕМ з мікроаналізом ПТ ПРЦЗ показує, що співвідношення  $\text{Ca}$  та  $\text{P}$  відповідає мінералу гідроксиapatиту. Додатково у складі мінералу було виявлено незначний вміст іонів  $\text{Fe}$ . Походження іонів  $\text{Fe}$  можна пояснити тим, що у тканині ЩЗ присутня велика кількість залізовмісних ферментів та інтенсивне кровопостачання (гемоглобін).

Інші типи біомінералізації ПРЦЗ також були досліджені гістологічними та електронно-мікроскопічними методами.

Між біомінералізацією стромі і капсули пухлини важко провести чітку межу, особливо у випадках їх поєднання та взаємних переходів. За невеликими винятками, біомінералізація капсули не є монолітною. Вона розгалужується на окремі пластини та «барикади», що обмежують пухлинні маси, знаходиться в контакті з ними.

Утворення великих та середніх за розмірами біомінеральних об'єктів з нерівними контурами у міжфолікулярних септах відноситься до стромальної мінералізації. Коли процес утворення біомінералів стає повзучим, із залученням більш дрібних сполучнотканинних перетинок, «кам'яніють» доволі великі ділянки не тільки пухлинного вузла, але й органа в цілому. У таких випадках для проведення рутинного гістологічного дослідження необхідна демінералізація. Для цього типу біомінералізації характерна присутність сателітних піскоподібних вогнищ відкладення кальцієвих мінералів. Формування великих неструктурованих кальцифікатів всередині сосочків або їх тотальну кальцифікацію також можна віднести до проявів стромальної мінералізації.

Важливим проявом патологічної біомінералізації в тканині ПРЦЗ є васкулярна мінералізація (Вм), яка уражає стінки судин. Цей феномен менш поширений у порівнянні з ПТ та стромальною кальцифікацією, але є стійким і повторюваним в різних зрізах і випадках. Цікаво, що судинна біомінералізація ушкоджує переважно внутрішній і середній шар судини середнього та великого діаметру, що відрізняється від подібного процесу при атеросклерозі. Пошкодження капілярів веде до їх «консервації» у вигляді статичних наслідків патологічного процесу.

Результати СЕМ з мікроаналізом інших типів біомінералізації ПРЦЗ показують подібний хімічний склад і співвідношення Са та Р у капсулах пухлинних вузлів, стромі та ПТ при ПРЦЗ, що відповідає гідроксиапатиту.

Присутність гідроксиapatиту є характерним також для інших локалізацій патологічних процесів з проявами кальцифікації.

Згідно даних СЕМ, мінералізований матеріал депозитів складався з різнорозмірних частинок довільної форми з ознаками крихких зламів по краях. Значний інтерес представляє визначення переважного кристалографічного орієнтування мінералу щодо поверхні залози.

У EDX спектрах, крім основних ліній Ca і P, часто присутні слабкі лінії S, K, Cl і деяких інших елементів. Співвідношення інтенсивностей ліній Ca і P близько до характерного для апатиту  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  (1,67 ат. %). Представлені дані демонструють широке розмаїття розмірів, форми і орієнтації кристалів кальцифікатів ЦЗ, хоча підтверджують їх фазову належність до нанокристалічного дефектного апатиту кальцію зі значним вмістом карбонатних заміщень у решітці. За даними ПЕМ, кристалічні частинки біомінералів, як правило, полідисперсні (різнорозмірні) і діапазон їх розмірів може бути доволі значним. Взагалі, за сумарною оцінкою морфології і розмірів кристалів, утвореної ними картини електронної дифракції, кожен зразок має свої специфічні особливості.

Для збереження більш великих фрагментів біомінеральних утворень після термічної обробки ми пропускали етап подрібнення неорганічної речовини у фарфоровій ступці. Таким чином вдалося зберегти комплексні фрагменти мінеральної речовини у вигляді відбитків, які тісно прилягали до м'яких тканин і зберегли їх форму. Дуже цінною знахідкою було виявлення «будівельного матеріалу», з якого склалися кальцифіковані капсули і оболонки. Він мав вигляд «бетонних» плит, суцільних та гофрованих пластин. Особливо вражає те, що в деяких випадках пластини мають характерну чітку товщину (5–10 мкм) та високі тривкісні характеристики, що обумовлено гідроксиapatитовою складовою конструкції. Безсумнівно, такі мінералізовані утворення, які співвідносяться з капсулою (оболонкою)

пухлинного вузла, можуть бути надійною перепорою на шляху поширення злоякісних пухлинних клітин.

Важливу інформацію у вивченні процесів біомінералізації ПРЦЗ надає імуногістохімічне дослідження. Мішенями імуногістологічного дослідження стали білки, які, на нашу думку, пов'язані з ключовими подіями пухлинного росту і процесу утворення біомінералів. Взагалі, біомінералізація – це процес синтезу мінералів живим організмом. Тканини, в яких утворюються мінерали називаються мінералізованими. У патології явища біомінералізації виникають як результат ушкодження тканини та загибелі клітин. На внутрішньоклітинний початок біомінералізації вказує наявність інтенсивної внутрішньоклітинної реакції при забарвленні препаратів алізариновим червоним S. До того ж кальцієві механізми ушкодження клітин є одними з основних при ушкодженні клітини. Часто це трапляється у ділянках некрозів, так як вивільнення активованих фосфатаз призводить до зв'язування іонів кальцію фосфоліпідами мембран. Отже, будівельним матеріалом для об'єктів патологічної біомінералізації є загиблі клітини.

Наша увага зосередилася на можливому зв'язку біомінералізації з проліферативним потенціалом пухлинних клітин (Ki-67), способом їх загибелі/елімінації (p53, bax/bcl-2), васкуляризацією і оксигенацією патологічного вогнища (VEGF), схильністю до інвазії та метастазування (MMP1) та процесами протидії мінералоутворення (OPN).

Результати бальної оцінки 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 у групах порівняння ( $p > 0,22$ ).

При співставленні 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 вказувати на можливий проапоптотичний вплив біомінералізації на пухлинні клітини ПРЦЗ. На відміну від бах, порівняння кількості експресованого антиапоптотичного білка bcl-2 у досліджуваних групах не відрізняється (відповідно  $3,5 \pm 0,28$  та  $3,6 \pm 0,28$ ;  $p > 0,8$ ).

При порівнянні результатів оцінки 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 ( $p > 0,42$ ). Низька експресія білка p53, очевидно представленого «диким» типом, характерна для обох груп ПРЦЗ. Важливою функцією «дикого» типу білка p53 є блокування синтезу антиапоптотичного білка bcl-2, який запобігає виходу цитохрому C з гігантських пор мітохондрій та зв'язує фактор ARAF1, що ініціює апоптоз. Як бачимо, результати нашого дослідження показують відносно низькі рівні експресії p53 та bcl-2 в обох групах, що не підтверджує їх можливу участь у розвитку та перебігу біомінералізації.

При співставленні результатів імуногістохімічного дослідження OPN зразки I групи показували достовірно вищий рівень експресії білка за умов біомінералізації ( $p < 0,008$ ).

При дослідженні експресії MMP1 між I групою ( $4,8 \pm 0,4$ ) та II групою ( $4,77 \pm 0,31$ ) зразків ПРЦЗ достовірної різниці також не було виявлено ( $p > 0,95$ ).

Статистична оцінка 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 ( $4,5 \pm 0,36$ ) ( $p < 0,049$ ).

Таким чином, різниця між результатами імуногістохімічного дослідження експресії бах ( $p < 0,001$ ), 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.

Разом з тим, наявність біомінералізації поєднується з достовірно вищим рівнем експресії бах у тканині злоякісної пухлини ЩЗ. Висока експресія білка бах та низька експресія його антагоніста bcl-2 свідчить про посилення і завершеність апоптозу у пухлинних клітинах.

Наявність патологічної біомінералізації призводить до високих рівнів експресії білка OPN у тканині ПРЩЗ. З іншого боку, зразки ПРЩЗ без кальцифікатів мають достовірно нижчий рівень експресії цих білків. Відомо, що остеопонтин є кислим фосфопротеїном, що експресується у мінералізованих тканинах і інгібує утворення гідроксиapatиту, зв'язуючись з поверхнею кристалів. Можна припустити, що гіперпродукція OPN пухлинними клітинами є фактором протидії біомінералізації.

При імуногістохімічному дослідженні OPN у тканині ПРЩЗ з ПТ був виявлений гістологічний феномен, який може сприяти встановленню причин їх ламінарності будови. На поверхні частини ПТ було виявлено відкладення рівного шару OPN. Раніше вважалося, що OPN конститутивно входить до складу ПТ. Молекула OPN, з'єднуючись з сполуками кальцію, стимулює їх ущільнення і порядкування, приймаючи участь у формуванні чергового шару (Рисунок 5).

Очевидно, що як пухлинний ріст, так і формування кристалів мінералів є аритмічними у своєму перебігу. Хвилеподібний перебіг циклу «загибель пухлинних і непухлинних клітин → ріст кальцифікату → синтез OPN і ріст пухлини → зупинка мінералізації → загибель пухлинних і непухлинних клітин» може обумовлювати шарувату структуру ПТ.

Важливою прогностичною ознакою для ПРЩЗ є рівень васкуляризації. Як показують результати дослідження, пухлинна тканина за умов наявності і

відсутності біомінералізації має різний ступінь рівня експресії VEGF. Було виявлено перевищення експресії фактору росту ендотелію у групі зразків ПРЦЗ з кальцифікацією над групою ПРЦЗ без неї ( $p < 0,05$ ). 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 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 і гіпоксії, що могло викликати підвищення експресії VEGF у відповідь. Гіпоксичне навантаження може додатково індукувати апоптоз шляхом білка p53, так як він накопичується через HIF-1 $\alpha$  (фактор, індукований гіпоксією) – залежний механізм.

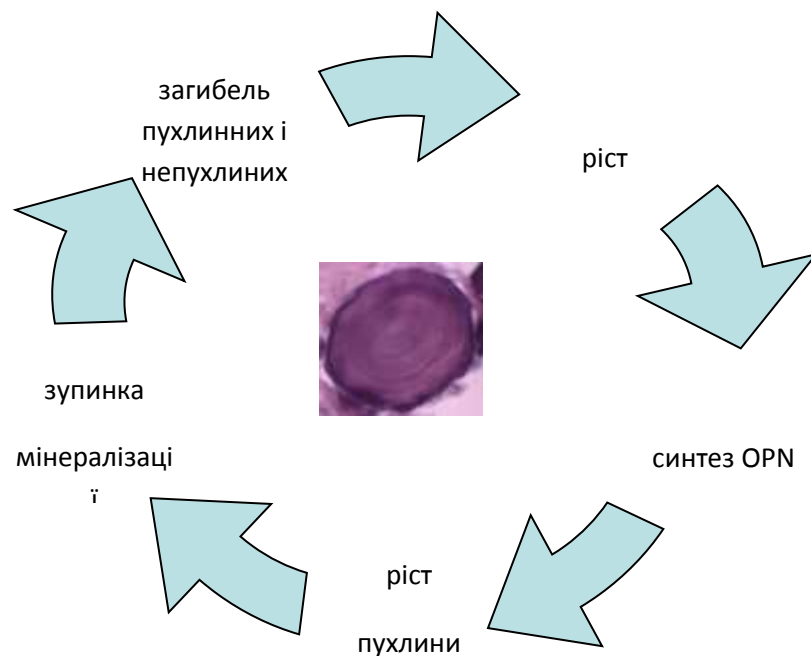


Рисунок 2.5. Гіпотетична схема формування шарів у ПТ.

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

Отримані дані в перспективі дозволять переглянути стандарти лікування папілярного раку щитоподібної залози з біомінералізацією у бік зниження агресивності лікувального процесу.

### **1.3 Морфогенез інфільтративного протокового раку молочної залози в умовах забруднення довкілля солями важких металів**

Результати дослідження показали, що у Сумській області відбулося зростання рівня захворюваності на РМЗ (2004 – 39 %, 2014 – 46 %). У жінок з «екологічно-чистих» районів випадки виявлення неоплазії в молочної залозі зустрічаються майже у 2 рази рідше (на 100 тис. населення), ніж у мешканок «екологічно-забруднених» регіонів Сумської області. Це свідчить про участь оточуючого середовища, поряд з добре-вивченими етіологічними факторами, в ініціюванні злякисного процесу.

У першій групі жінок з «екологічно-забруднених» районів випадки ІПРМЗ з низьким ступенем диференціювання (G2 та G3) зустрічали частіше, ніж у жінок другої групи з «екологічно-чистих» районів, що підтверджено статистичними розрахунками ( $p < 0,05$ ). Це говорить про участь ВМ у прогресуванні пухлинного процесу, який супроводжується підвищенням рівня проліферативної активності клітин, зростанням ступеня їх атипії та прогресуючої анаплазії.

Згідно даних атомно-абсорбційної спектрофотометрії кількість Fe в тканині ІПРМЗ складає від 38,46 до 69,63 мкг/г (в середньому  $59,73 \pm 8,44$  мкг/г), Cu – від 2,8 до 9,11 мкг/г (в середньому  $5,66 \pm 1,49$  мкг/г), Cr

– від повної його відсутності до 6,1 мкг/г (в середньому  $2,41 \pm 0,93$  мкг/г), Zn – від 1,89 до 6,4 мкг/г (в середньому  $4,25 \pm 0,99$  мкг/г), Pb – від повної відсутності до 0,6 мкг/г (в середньому  $0,11 \pm 0,07$  мкг/г) та Ni – від 0,08 мкг/г до 0,52 мкг/г (в середньому  $0,3 \pm 0,06$  мкг/г). Встановлено статистично достовірну різницю між накопиченням ВМ у двох групах тканин ( $p < 0,05$ ). Кількість Fe в контрольній групі менше на 24 % ( $p = 0,001$ ), Cu – на 15,4 % ( $p = 0,002$ ), Cr – на 16,8 % ( $p = 0,016$ ), Zn – на 13,8 % ( $p = 0,005$ ), Pb – на 11,1 % ( $p = 0,026$ ) та Ni – на 9,3 % ( $p = 0,011$ ). Загальна кількість ВМ у першій групі складає від 71,36 до 84,86 мкг/г (в середньому  $78,63 \pm 3,47$  мкг/г), у другій групі – від 51,21 до 73,2 мкг/г (в середньому  $61,02 \pm 5,77$  мкг/г). Як бачимо, вміст вищезазначених елементів у контрольній групі на 22,4 % менше, ніж у дослідницькій вибірці тканин ( $p < 0,05$ ). При аналізі хімічного складу компонентів препаратів ППРМЗ, розташованих на спектрально-чистому графіті, встановлено, що більше накопичує ВМ паренхіматозний компонент пухлинної тканини ( $p < 0,05$ ). На нашу думку пояснюється це тим, що саме клітини раку за рахунок порушення ендо-екзоцитозу хімічних речовин накопичують у середині мікроелементи, відповідно при зростанні їх кількості в судинах кровообігу (за рахунок підвищеного надходження СВМ до організму). Підтвердженням цього є дані, отримані при порівнянні хімічного складу двох груп дослідження. Отримані результати показують, що вміст ВМ у першій групі на 15–25 % більший за кількість їх у жінок з «екологічно-чистих» районів області.

За результатами наших досліджень встановлено, що патологічна біомінералізація на 19 % частіше зустрічається в першій групі, ніж у другій, що не може не вказувати на участь ВМ на процес мінералоутворення. Згідно отриманих даних за допомогою енерго-дисперсійної спектроскопії, які показали присутність ВМ в структурі конкрементів (до 10 %), можна припустити, що такі мікроелементи як Fe, Zn, Cu, Cr та Ni, потрапляючи до пухлинної тканини, вступають у ковалентні зв'язки з солями кальцію. Вони

можуть заміщувати іони кальцію у зовнішній частині молекули гідроксиапатиту. Участь ВМ у процесі петрифікації пухлинної тканини молочної залози можна розглядати ще і через механізм прямого осадження та зв'язування з органічною матрицею (білками). При пролонгації патології в процес залучаються оточуючі тканини, з чим пов'язано наявність обідка мінералізації навколо більш структурованих відкладань солей кальцію. Наявність прямого кореляційного зв'язку між петрифікацією та експресією OPN ( $p < 0,05$ ) вказує на безпосередню участь останнього у формуванні вогнищ мінералізації у тканині РМЗ. Доведений прямиий вплив ВМ на ініціювання синтезу OPN ( $r = 0,43$ ,  $p < 0,05$ ). Загальна схема впливу ВМ на процес біомінералізації та участь останньої у прогресуванні РМЗ зображена на Рисунок 1.

Наступною гістологічною ознакою прогресування ІПРМЗ, яку ми вивчали за допомогою забарвлення препаратів гематоксилін-еозином та імуногістохімічним методом з використанням антитіл до VEGF, було визначення рівня васкуляризації пухлинної тканини та наявність прихованого потенціалу у ракових клітин до цього процесу. Як показують результати дослідження, неопластична тканина має різний ступінь васкуляризації, який залежить від кількох факторів. По-перше, наявність позитивного кореляційного зв'язку між рівнем васкуляризації, рівнем експресії VEGF та ступенем диференціювання ІПРМЗ ( $r = 0,46$  та  $r = 0,42$  відповідно) вказує на посилення ангіогенезу в процесі анаплазії пухлини. По-друге, наявність зв'язку між експресією VEGF та накопиченням ВМ у пухлинній тканині ( $r = 0,33$ ,  $p < 0,05$ ) говорить про посилення ангіогенезу у міру надходження ВМ до неопластичної тканини, особливо Cu ( $r = 0,59$ ,  $p < 0,05$ ). Новоутворені капіляри мають функціонально нестабільну судинну стінку, яка, по-перше, більш доступна для проростання раковими клітинами і метастазування, по-друге, процеси абсорбції всіх речовин, в тому числі і ВМ, відбуваються інтенсивніше, ніж у інтактній тканині молочної залози. Це

знову ж таки призводить до накопичення металів у пухлинній тканині і запуску всіх його патологічних впливів на морфогенез неопластичного процесу.

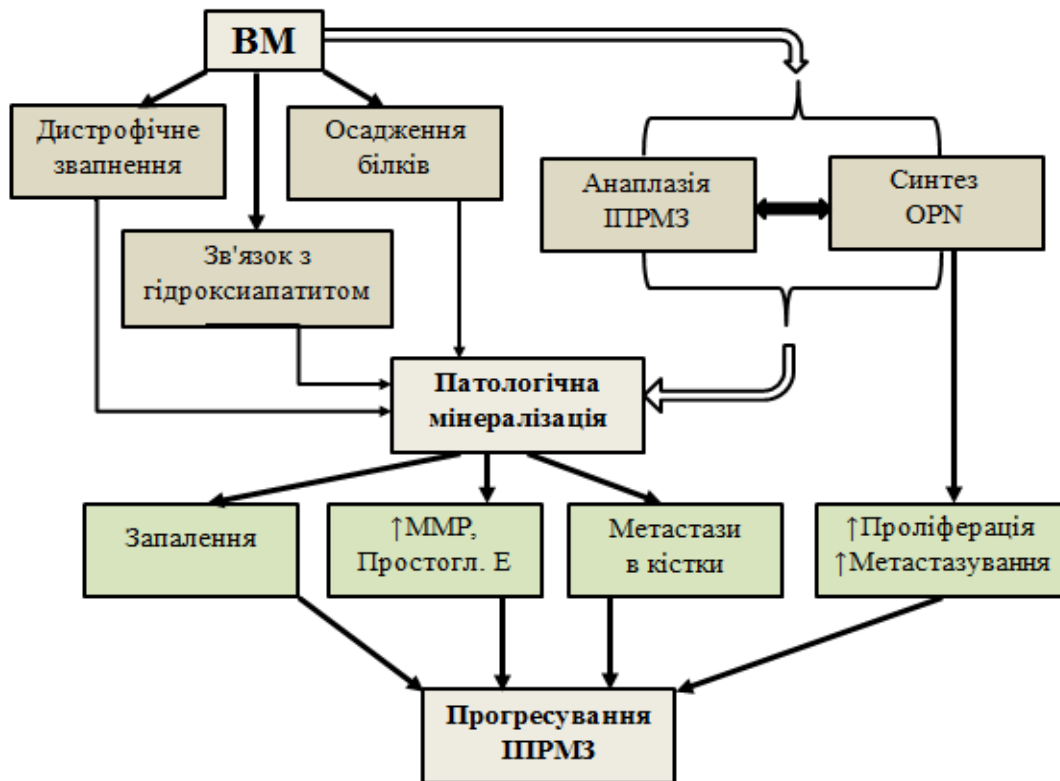


Рисунок 3.1. Схема взаємозв'язку між надходженням ВМ до тканини МЗ та синтезом OPN і процесом прогресування ІПРМЗ.

Наші дослідження стосовно вивчення експресії ER та PR, показують, що у жінок, які мешкають в «екологічно-забруднених» регіонах Сумської області, їх рівень нижчий за той, що виявлено в контрольній групі ( $p < 0,05$ ). За великим рахунком, це є найбільш негативним показником впливу ВМ на перебіг злоякісного процесу у молочній залозі, тому як наявність стероїдних рецепторів є найпотужнішим прогностично-сприятливим маркером перебігу захворювання і чутливістю пухлини до терапії. Ми виявили, що зменшення

кількості ER виникає при зростанні кількості ВМ у пухлинній тканині ( $r=-0,7$ ,  $p<0,05$ ), які реалізують інгібуючий вплив через наступні механізми:

- метилювання ДНК та підвищення кількості MGMT, продукти функціонування якої мають пригнічуючий вплив на ER;
- пряме та опосередковане стимулювання запалення та пригнічення транскрипції ERS;
- виснаження рецепторів естрогену ВМ, які мають естрогеноподібну активність;
- втрату рецепторів у процесі фенотипічного спрощення, яке підтримується зростаючим надходженням ВМ до ракових клітин.

Враховуючи наявність зв'язку між рівнем накопичення ВМ у тканині ППМЗ і рівнем експресії HER2/neu ( $r=0,36$ ,  $p<0,05$ ), можна стверджувати про вплив мікроелементного складу тканини на чутливість до факторів росту. Реалізація цього механізму може відбуватися або за безпосереднього впливу ВМ на ДНК, яке призводить до ампліфікації гену ERBB2, або за рахунок стимуляції синтезу шаперонів, які залучені у механізми стабілізації HER2/neu та передачі сигналів до мітотичних посередників.

Білок p53 було виявлено у 40 % випадків ППМЗ. Ми виявили зв'язок між накопиченням ВМ та рівнем експресії p53 ( $r=0,31$ ,  $p<0,05$ ). За рахунок впливу на ген P53, мікроелементи інгібують регуляторну «сторожеву» функцію дикого типу p53. В результаті цього мутантний тип p53 накопичується в клітині, імітуючи наявність проапоптичного дикого p53, в результаті чого клітина набуває «автономії», запускаючи каскади проліферативних стимулів та антиапоптичні сигнали, що приводять до прогресування злоякісного процесу. Підтвердженням цього є наявність позитивного кореляційного зв'язку ( $r=0,49$ ,  $p<0,05$ ) між експресією білків p53 та Ki-67, bcl-2 та p53 ( $r=0,34$ ,  $p<0,05$ ). Це вказує на взаємозв'язок між підвищенням проліферативної активності та збільшенням внутрішньоклітинного mt p53. Тобто в процесі канцерогенезу участь ВМ

може бути пусковим механізмом, який у подальшому підтримується аутогенними патологічними механізмами. За умови підвищення потенціалу клітини до поділу під впливом екзогенних чинників при умові відсутності проапоптичного блоку збільшується кількість мутації, в тому числі і гену p53, які в подальшому знову провокують поділ клітин. При надлишковій кількості мутантного p53 відбувається зменшення кількості дикого p53, що призводить до пригнічення блокування функції bcl-2, а це в свою чергу надає клітині можливості до подальшого функціонування і прогресування злоякісного процесу. Наявність прямого кореляційного зв'язку між кількістю VM у тканині ППМЗ та експресією Ki-67 ( $r=0,51$ ,  $p<0,05$ ) та bcl-2 ( $r=0,29$ ,  $p<0,05$ ) вказує на безпосередню участь елементного складу клітин на стійкість до апоптозу та підвищення мітотичної активності. Не є випадковими і результати щодо поєднання у 92 % випадків експресії ER та bcl-2, тому що, згідно результатів літературних даних, ген Bcl-2 є, як і у випадку гену, який кодує PR, естроген-залежним геном.

Поширення злоякісного процесу на навколишні тканини та їх метастазування можливе за рахунок декількох факторів: неконтрольований ріст, втрата адгезивних властивостей, розщеплення навколишніх тканин. Останній процес стає можливим за рахунок набуття раковими клітинами протеїназної активності. Одним з таких маркерів виступає MMP1. Як показали результати нашого дослідження, неопластичні клітини ПМЗ майже у 60 % випадків володіли цією функцією, що вказує на спроможність до безмежного поширення. Наявність кореляційного зв'язку між кількістю MMP1 та хімічним складом тканини ППМЗ, а саме рівнем цинку ( $r=0,61$  для паренхіми та  $r=0,33$  для строми,  $p<0,05$ ), говорить про участь останнього у процесі посилення міграційної активності пухлини. Пояснити цей факт можна тим, що MMP1 є цинквмісним ферментом, і при підвищеному надходженні Zn до пухлинних клітин, він використовується на утворення



цього білка, що є індикатором негативного впливу ВМ на перебіг злоякісного процесу.

Дослідження адгезивних властивостей пухлинних клітин РМЗ показують, що при накопиченні ВМ у пухлинній тканині молочної залози знижується рівень експресії Е-кадгерину ( $r=-0,32$ ,  $p<0,05$ ), який є індикатором сили міжклітинної взаємодії. Не випадковим є і негативний кореляційний зв'язок між експресіями Е-кадгерину і MMP1 ( $r=-0,48$ ,  $p<0,05$ ), враховуючи факт поширення пухлинного процесу при наявності колагеназної активності у випадку присутності позитивної імуногістохімічної реакції при дослідженні MMP1 та зменшення сили міжклітинних контактів за умови зниження експресії Е-кадгерину. Це ж саме стосується і наявності віддалених метастазів, наявність яких супроводжується зниженням внутрішньоклітинного білка Е-кадгерину і зростання експресії MMP1. На підставі отриманих результатів можна стверджувати, що при накопиченні ВМ у пухлинній тканині остання набуває додаткових можливостей до розповсюдження. Це знижує як виживаність хворих жінок, так і можливість радикального оперативного втручання за наявності стрімкого росту неоплазії і появи метастатичного ураження лімфатичних вузлів.

Згідно результатів нашого дослідження майже у 80 % випадків виявлено позитивну реакцію щодо експресії hsp90 $\alpha$ . Хоча і не виявлено прямого кореляційного зв'язку між накопиченням ВМ у пухлинній тканині та рівнем внутрішньоклітинної кількості білків шаперону ( $p>0,05$ ), при порівнянні результатів імуногістохімічного дослідження між двома групами тканин виявлено, що у тканині ПРМЗ першої групи його показники були вищими за ті, що отримані в контрольній групі ( $p<0,05$ ). Це не є випадковістю, адже підвищене надходження ВМ до організму стимулює продукцію захисних ферментів, в якості яких виступають саме шаперони. Наявність зв'язку між експресією hsp90 $\alpha$  та запальною інфільтрацією в пухлинному оточенні є індикатором захисної функції неопластичних клітин

на дію продуктів запалення, що виникає, як було показано нашими дослідженнями, під дією ВМ та контакті ракових клітин з імуніцитами. Це призводить до зростання опору пухлинних клітин до несприятливого впливу мікрооточення. При цьому виникає перехресна резистентність клітин до інгібуючих впливів як макроорганізму, так і терапевтичних засобів. Hsp90, впливаючи на ER та PR, з одного боку зміцнює їх структуру, з іншого регулює діяльність білків Akt і NF- $\kappa$ B, які залучені в процес інгібуючого впливу на транскрипцію гену ERS, кодуючого ER. Він перешкоджає переходу рецептора в активний конформаційний стан. Шаперон 90 сприяє активації антиапоптичних білків (bcl-2) і блокує білок Araf-1, який відповідальний за активацію внутрішнього апоптозного шляху. Таким чином, зміцнюється розвиток резистентності ракових клітин перед їх запрограмованою загибеллю. Негативний вплив hsp90 реалізується також через підтримку конформаційного дозрівання і репарації таких білків як p53, ангіогенний фактора HIF-1 $\alpha$ , VEGF, MMP1 та інші.

Постійна присутність шаперону у випадках HER2/neu позитивних варіантів ІПРМЗ підтверджує його участь у пухлинній прогресії РМЗ. Hsp90 $\alpha$  стабілізує HER2/neu і модулює їх ефект. Це може пояснити той факт, чому ампліфікація ERBB2 гена не завжди супроводжується експресією HER2/neu, що може бути пов'язано з відсутністю hsp90 $\alpha$ .

Згідно результатів нашої роботи, перебіг пухлинного процесу у 44 % випадків супроводжувався наявністю імунної реакції в пухлинному просторі, яка корелювала з вмістом ВМ у пухлинній тканині ( $p < 0,05$ ). Без сумніву, імунна система в макроорганізмі виступає фактором агресії по відношенню до чужорідних агентів, якими виступають пухлинні клітини, яка з одного боку обмежує поширення неопластичного процесу, а з іншого проявляє цитотоксичну активність по відношенню до фенотипово-чужорідних ракових клітин. Але при постійному контакті імуніцитів з неопластичними клітинами лейкоцити впливають на перебіг ІПРМЗ у вигляді негативного фактору,

підвищуючи проліферативну активність клітин, їх здатність до розповсюдження, синтезу значної кількості біологічно-активних речовин. Як показують дані нашого дослідження, якісний склад лейкоцитарного інфільтрату дуже варіабельний у кожному окремому випадку. Залежить це перш за все від кількості В- та Т-лімфоцитів, серед яких знаходиться значна кількість гранулоцитарних лейкоцитів та макрофагів. Зростання інтенсивності інфільтрації залежало в більшості випадків від ступеню атипії неопластичних клітин, що говорить про зростання імуногенної активності при підвищенні анаплазії пухлинних клітин, які стають все більш чужорідними для макроорганізму. Наявність імунної відповіді на відкладання солей кальцію у пухлинному полі РМЗ є індикатором реакції організму на чужорідний компонент тканини молочної залози. На нашу думку, в процесі контакту ракових клітин з лейкоцитами відбувається активація обох ланок імунітету: гуморального і клітинного. Наявність кореляційного зв'язку між зростанням кількості В лімфоцитів в імунному інфільтраті та зниженням експресії ER ( $r=-0,49$ ,  $p<0,05$ ) є індикатором інгібуючого впливу гуморальної імунної відповіді на експресію рецепторів до стероїдних гормонів. Під впливом інтерлейкіну 1 відбувається перехід NF- $\kappa$ B у активну форму. NF- $\kappa$ B стимулює протеїназу В, яка інгібує активність транскрипційного фактору FOXO3A, який має стимулюючий вплив на транскрипцію ERS. Також NF- $\kappa$ B залучений у процеси активування білків EZH2 та BLIMP-1, які пригнічують зчитування інформації з гену, який кодує естрогенові рецептори. Таким чином, інгібуючи активатори транскрипції та активуючи її інгібітори, відбувається пригнічення транскрипції ERS.

Епігенетичні зміни ДНК чинять як блокуючий, так і активуючий вплив на гени, які кодують життєво-необхідні білки для клітини. Один з таких варіантів змін, а саме рівень загального метилювання ДНК, ми вивчили за допомогою ІЧ спектроскопії. Наявність різного ступеню коливання  $-CH_3$  групи, яке відбувається у діапазоні коливання азотистих основ (4000–

2000  $\text{cm}^{-1}$ ), говорить про різний ступінь патологічного метилювання аденіну, гуаніну, цитозину або додаткового приєднання  $-\text{CH}_3$  групи до тиміну. Ми спрямували наші дослідження на встановлення рівня метилювання ДНК та його зв'язку з показниками хімічного аналізу неопластичної тканини, даними експресії прогностичних рецепторів. Як видно з результатів нашої роботи ДНК тканини ІПРМЗ має різний ступінь приєднання  $-\text{CH}_3$  групи до азотистих основ. Наявність кореляційного зв'язку між цими показниками та кількістю ВМ ( $r=0,41$ ,  $p<0,05$ ), виявлених у тканині при спектрофотометрії, вказує на екзогенну природу епігенетичних змін ДНК. Цей факт не є випадковістю, адже ВМ залучені в безліч внутрішньоклітинних процесів, в тому числі і перенесення електронів і активних груп ( $\text{CH}_3$ , O, S). Дані імуногістохімічного дослідження показують, що рівень метилювання ДНК позитивно корелює з рівнем експресії білка p53, що опосередковано підтверджує активуючий вплив приєднаної  $-\text{CH}_3$  групи на транскрипцію гену P53. Отже, екзогенне надходження СВМ до організму призводить до осадження останніх у пухлинній тканині і метилювання ДНК. За рахунок підвищеної кількості деметилювального ензиму MGMT відбувається зняття металних груп з ДНК пухлинної тканини. Розпізнавальна послідовність протеїну з'єднується з пошкодженою нуклеїновою кислотою і забирає алкільний залишок. Це іноді відіграє негативну роль, у випадку використання хіміопрепаратів, які як раз направлені на приєднання алкільної групи до ДНК і запуску таким чином апоптозу ракових клітин.

Наявність кореляційного зв'язку між рівнем метилювання ДНК та ступенем експресії MGMT ( $r=0,53$ ,  $p<0,05$ ) вказує на послідовність подій у разі надходження ВМ до пухлинної тканини. Останні, викликаючи надмірне патологічне метилювання ДНК, стимулюють активацію репаративних систем, якою виступає білок MGMT, котрий незворотно усуває приєдану  $-\text{CH}_3$  групу з азотистих основ (Рисунок 2).

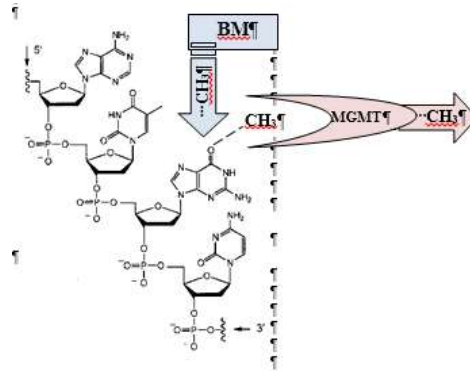


Рисунок 3.2. Схема метилювального ефекту ВМ на ДНК клітини і деметилювальної дії MGMT.

Як показують результати нашого дослідження при зростанні кількості MGMT знижується рівень експресії ER та PR ( $r=-0,5$ ,  $p<0,05$ ). Пояснюємо це тим, що утворена в результаті взаємодії з  $-CH_3$  групою MGMT інактивується і вступає у взаємозв'язок з рецепторами до стероїдних гормонів, пригнічуючи їх функцію. При зростанні кількості приєднаних метильних груп, збільшується кількість MGMT, відповідно, знижується чутливість до антигормональних препаратів клітин ПРМЗ.

Ще однією особливістю MGMT є те, що її кількість зростає у міру збільшення рівня фрагментації ДНК ( $r=0,54$ ,  $p<0,05$ ). Ці ж дані отримані і в наших дослідженнях, що говорить про синхронність регуляторних процесів та тісний взаємозв'язок між всіма внутрішньоклітинними процесами. Результати нашого дослідження показують, що має місце позитивний кореляційний зв'язок між рівнем фрагментації ДНК та накопиченням у тканині ПРМЗ ВМ ( $r=0,49$ ,  $p<0,05$ ). Одночасно з підвищенням рівня фрагментації ДНК знижується чутливість тканини до антигормональних

препаратів, про що говорить негативний зв'язок між фрагментацією ДНК та наявністю ER ( $r=-0,53$ ,  $p<0,05$ ).

Отже дестабілізація генетичного матеріалу, у вигляді її фрагментації, призводить до прогресування пухлинного процесу. Цей факт також підтверджується зростанням рівня експресії білка Ki-67 ( $r=0,62$ ,  $p<0,05$ ), що є маркером проліферативної активності клітин, та сильним кореляційним зв'язком між рівнем білка p53 та ступенем фрагментації ДНК ( $r=0,77$ ,  $p<0,05$ ), що говорить про взаємозв'язок між рівнем мітотичної активності ракових клітин, порушенням їхнього проапоптичного потенціалу та рівнем дестабілізації геному.

Враховуючи отримані результати загальну схему впливу ВМ на фрагментацію ДНК через посилення мітотичної активності та наявність mt p53 можна представити наступним чином (Рисунок 3).

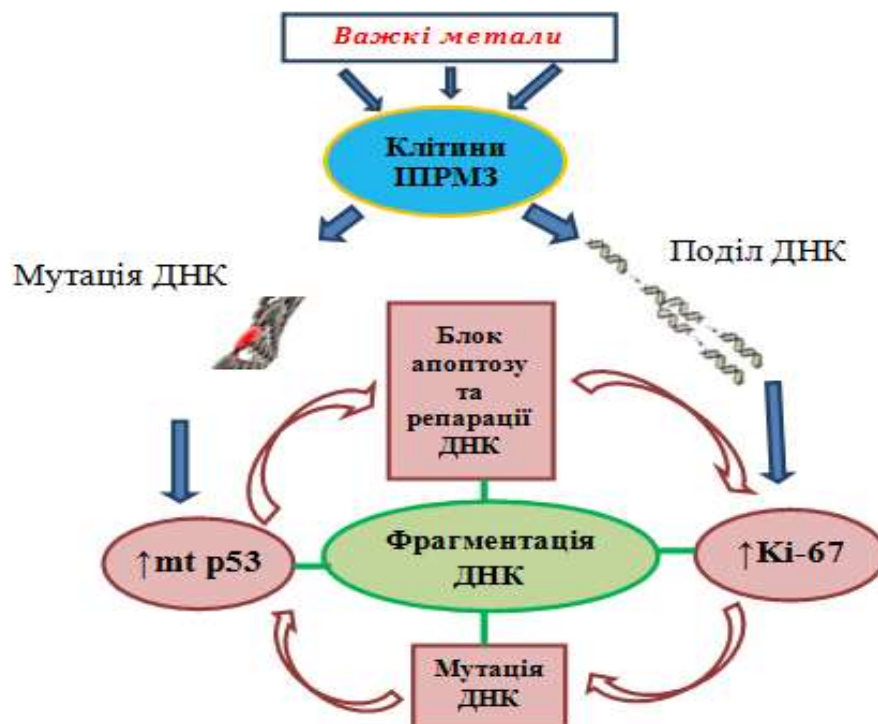


Рисунок 3.3. Схема впливу ВМ на фрагментацію ДНК.

Звісно, дестабілізуючий вплив СВМ на ДНК може реалізовуватись і через прямий негативний вплив на генетичний матеріал, викликаючи утворення одно- та двониткових розривів, як через вплив на геном продуктів перекисного окиснення ліпідів та активних форм кисню, які утворюються за умови надлишку ВМ у клітині, так і через прямий контакт ВМ з молекулою ДНК.

Узагальнюючи всі отримані результати можна стверджувати, що при підвищеному надходженні СВМ до організму жінок іони ВМ у тканині молочної залози виступають додатковим «кофактором» розвитку неопластичного процесу. У процесі морфогенезу ІПРМЗ ВМ стимулюють проліферативну активність клітин, їх дедиференціювання, міграційну спроможність, дестабілізацію генетичного матеріалу та наявність інших несприятливих прогностичних факторів онкологічного процесу, змінюють якісні характеристики пухлинної тканини і фенотипічні особливості ракових клітин, пригнічують експресію або безпосередньо, або опосередковано, прогностично-сприятливих рецепторів у тканині ІПРМЗ, що призводить до прогресування злоякісного процесу та подальшого розповсюдження по організму.

## ВИСНОВКИ

1. Інтенсивний показник запальних захворювань тканин пародонта за останні десять років у північних областях України характеризувався тенденцією до його зростання і підвищився до 0,445 ‰ у 2011 році та до цього часу залишається на високому рівні.

2. Стоматологічний статус дитячого населення супроводжується погіршенням стану мікробіоценозу ротової порожнини у 34,5 % випадках. У дорослого населення соматична патологія супроводжувалася змінами зі сторони тканин пародонта, з деструктивними змінами та подальшою хронізацією запалення, утворенням нодулярного типу запального інфільтрату.

3. У хворих при пародонтитах та епулісах встановлено гістологічні, імуногістохімічні, біохімічні, алкілувальні особливості патогенетичних механізмів розвитку ушкодження тканин пародонта. Виявлений зв'язок між атеросклеротичним процесом та запальною пародонтальною реакцією, яка обумовлена підвищеною експресією MMP-1 епітелієм до  $(95,8 \pm 2,43) \%$  ( $p < 0,001$ ).

4. Бактеріальна колонізація у хворих із запальними захворюваннями пародонта представлена широким спектром мікроорганізмів, серед яких основною асоціацією є *Porphyromonas gingivalis* з *Candida albicans* – 58 %.

5. Пародонтити та епуліси супроводжуються порушеннями у структурній організації ДНК клітин пародонта, що проявляється гіперметиляцією, спричиненою дією бактерій, які зумовлюють прогресування запального процесу та зменшення репаративної здатності клітин пародонта. При цьому відсоток інфрачервоних смуг поглинання -CH<sub>3</sub> групи ДНК становить  $(10,39 \pm 2,44) \%$  ( $p = 0,001$ ), що призводить до інактивації генів.

6. Найбільш виразне метилування ДНК фібробластів пародонта відзначалося продуктами *Candida albicans* і проявлялося блокуванням репаративного ензиму MGMT. Доведена можливість комплексного



неспецифічного індукованого підвищення експресії MGMT у тканинах пародонта бактеріальними продуктами на початкових стадіях модельованого пародонтиту. Виявлена різна залежність рівня експресії гена MGMT при запаленні пародонта, яка спричинена досліджуваними бактеріями. Установлена імовірність кумулятивної дії ендо- та екзотоксинів бактерій на експресію гена MGMT.

7. Патологічні зміни у тканинах пародонта та крові під впливом дії іонів хрому та кобальту зумовлені накопиченням на 40-ву добу експерименту іонів хрому у кістковій тканині до  $(1,73 \pm 0,61, P < 0,05)$  та іонів кобальту до  $(0,2 \pm 0,017, P > 0,05)$ . Іони хрому спричиняють зменшення кількості В-, Т-лімфоцитів.

8. Роль ясеневого епітелію у патогенезі розвитку пародонтиту полягає у резорбції альвеолярного відростка кістки шляхом синтезу MMP-1. Підвішена продукція OPN ясеневим епітелієм посилює міграцію імунних клітин у вогнище запалення. Синтез VEGF епітелієм сприяє поступовому вrostанню судин у різні види епулісів, що призводить до кумуляції ефекту міграції імунних клітин крові і, як наслідок, до збільшення кількості нейтрофілів та макрофагів.

9. Патогенетично обґрунтований шлях переходу запалення пародонта у різні види епулісів, який обумовлений гіперметилуванням ДНК та змінами експресії MGMT. За результатами кластерного та факторіального аналізів створені узагальнюючі моделі росту та прогнозування різних типів епулісів  $Y = 0,62 F1 + -0,71F2 + -0,74 F3 + 1,44 F4 + 0,53 F5 + -0,76F6$  – для фіброзного епулісу;  $Y = -0,024F1 + 0,09 F2 + -1,36 F3 + -0,73 F4 + 0,65 F5 + 0,63 F6 + 0,71 F7$  – для гігантоклітинного епулісу;  $Y = 2,15 F1 + 1,36F2 + -0,67 F3 + -0,77 F4 + 0,53 F5 + 0,61 F6 + 0,61 F7$  – для ангіоматозного епулісу.

10. У хворих на гігантоклітинні епуліси виявлено р53 та Т-лімфоцитарну роль у формуванні гігантських клітин шляхом злиття  $F3 = CD3 -0,74 + p53 -$

0,62. Велика кількість гігантських клітин макрофагального походження спричинює резорбцію альвеолярного відростка. Зміни клітинної ланки імунітету при пародонтитах пов'язані з метилуванням ДНК клітин стромы гігантоклітинного епулісу, що призводить до його прогресування.

11. Ig G та IgM сприяють фагоцитуванню мікробних клітин при запаленні пародонта та утворюють одну з головних ланок у патогенезі різних типів епулісів та опосередковано стимулюють накопичення різних хімічних елементів у гігантських клітинах  $\text{Cu}^{2+}$  до  $2,61 \pm 1,3 \%$  ( $P > 0,05$ ),  $\text{Fe}^{3+}$  до  $6,69 \pm 0,05\%$  ( $P < 0,01$ ),  $\text{Co}^{2+}$  до  $11,7 \pm 0,14 \%$  ( $P < 0,05$ ).

12. На підставі проведених імуногістохімічних та статистичних досліджень ми запропонували панель маркерів для діагностики різних типів епулісів, яка включає IgG-, IgM-, MMP-1-, MPO-, CD3-, CD68-, OPN-, S100-, VEGF-, Ki-67-ензими. Діагноз гігантоклітинний епуліс може бути верифікований на підставі такого імунофенотипу гігантських клітин: позитивна реакція (+) з маркерами CD 68, OPN, S100 та негативна (-) з маркерами Ki-67, CD3. Діагноз ангіоматозний епуліс може бути верифікований на підставі наступного імунофенотипу: позитивна реакція (+) з маркерами VEGF, MGMT, Gli Ki-67 – та негативна реакція (-) маркерів OPN, S100. Діагноз фіброзний епуліс може бути верифікований на підставі такого імунофенотипу: позитивна реакція (+) з маркерами IgM, MMP-1, MPO, CD3 та негативна реакція (-) з маркером IgG.

13. Захворюваність на РЦЗ в Сумській області за період з 2004 по 2014 рр. в середньому склала  $8,22 \pm 0,83\%$ , тоді як цей показник по Україні складає  $5,3 \pm 0,49\%$ . Має місце зростання захворюваності на РЦЗ в Сумській області з 6,9 на 100 тис. населення в 2004 р. до 15,1 на 100 тис. населення в 2014 р. Пік захворюваності на РЦЗ відмічався у хворих від 40 до 59 років ( $49,55 \pm 4,15$ ). Із зареєстрованих 1131 випадків РЦЗ питома частка ПРЦЗ склала 837 (в середньому – 74,0%), ФРЦЗ – 226 випадки (20%), МРЦЗ – 45 випадки (4%), інші форми – 23 випадки (2%).

14. При біомінералізації ПРЦЗ було виділено такі її типи: псамомні тільця, стромальна та васкулярна біомінералізація. При аналізі випадків ПРЦЗ не виявлено різниці між розмірами пухлин за наявності та відсутності кальцифікатів ( $p > 0,05$ ). Частота виявлення біомінералізації ПРЦЗ у чоловіків нижча, ніж у жінок. Зв'язку між біомінералізацією та віком пацієнтів не було виявлено.

15. Результати рентгенівської дифракції (XRD-EDS) та СЕМ з мікроаналізом показують подібний хімічний склад і співвідношення Са та Р у всіх типах біомінералізації ПРЦЗ, який відповідає нанокристалічному дефектному гідроксиапатиту кальцію зі значним вмістом карбонатних заміщень у решітці. У EDX спектрах, крім основних ліній Са і Р, часто присутні слабкі лінії Fe, S, К, Cl і деяких інших елементів. Згідно з даними скануючої та просвічуючої мікроскопії, мінералізований матеріал депозитів складався з різнорозмірних частинок довільної форми з ознаками крихких зламів по краях. Кристалічні частинки біомінералів були полідисперсні у широкому діапазоні. За сумарною оцінкою морфології і розмірів кристалів, картини електронної дифракції, кожен зразок має свої специфічні особливості.

16. Встановлена 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, що свідчить про їх участь у процесах патологічної біомінералізації за умов даної патології. Висока експресія білка *bax* та низька експресія його антагоніста *bcl-2* у мінералізованій тканині ПРЦЗ свідчить про посилення апоптозу у пухлинних клітинах. Виявлена гіперпродукція *OPN* пухлинними клітинами є можливим фактором протидії біомінералізації ПРЦЗ. Високий рівень експресії *VEGF* може свідчити про більш високий рівень гіпоксії в тканині мінералізованого ПРЦЗ.

17. Порівнюючи випадки ПРЦЗ з наявністю метастазів, відзначили, що мінералізовані зразки пухлин досягають більших розмірів у порівнянні з випадками без проявів кальцифікації ( $p < 0,02$ ), у них виявлено достовірно вищий рівень експресії *bax* ( $p < 0,001$ ), *OPN* ( $p < 0,008$ ) і *VEGF* ( $p < 0,012$ ). У групі зразків ПРЦЗ без мінералізації виявлено вищий рівень експресії *bcl-2* ( $p < 0,04$ ). Таким чином, оцінюючи вплив біомінералізації на перебіг ПРЦЗ, можна стверджувати про її сприяння в обмеженні росту та поширенню пухлини.

18. У групі хворих на ПРЦЗ з біомінералізацією псамомні тільця виявлялися у 80%, їх кількість у кожному випадку варіювала від одного до кількох десятків. Величина діаметра ПТ варіювала від 39,79 до 181,87 мкм (в середньому  $77,49 \pm 7,24$  мкм). Товщина шару (ламели) псамомного тільця коливалася від 3,5 до 9,3 мкм ( $7,08 \pm 0,91$  мкм). Остеопонтин, відкладаючись на поверхні псамомних тілець і з'єднуючись зі сполуками кальцію, стимулює їх ущільнення та організацію, приймаючи участь у формуванні їх шаруватої структури.

19. За період з 2004 по 2014 роки в Сумській області відмічено зростання захворюваності на рак молочної залози з 39 до 46 % відповідно. Жінки, які проживають в «екологічно-забруднених» районах Сумської області, майже у два рази частіше хворіють на рак молочної залози, ніж жінки, які мешкають у відносно «екологічно-чистих» районах. В обох групах районів переважає інфільтративний протоковий рак молочної залози (91 %). В «екологічно-забруднених» районах переважають пухлини з низьким ступенем диференціювання (G2 і G3).

20. За умов забруднення довкілля солями важких металів у тканині інфільтративного протокового раку молочної залози зростає вміст іонів важких металів ( $p < 0,05$ ), який у другій групі на 22,4 % менше, ніж у першій, що зумовлює більш агресивний перебіг злоякісного процесу. Вміст Fe у

пухлинній тканині в «екологічно-забруднених» районах на 24 % більший, ніж в «екологічно-чистих» районах ( $p=0,001$ ), вміст Cu – на 15,4 % ( $p=0,002$ ), Cr – на 16,8 % ( $p=0,016$ ), Zn – на 13,8 % ( $p=0,005$ ), Pb – на 11,1 % ( $p=0,026$ ) та Ni – на 9,3 % ( $p=0,011$ ). Дані, отримані при енерго-дисперсійній спектроскопії, підтверджують результати елементного складу неопластичної тканини. Вміст важких металів більш високий у паренхіматозному компоненті пухлини у порівнянні зі строною ( $p<0,05$ ).

21. Підвищення кількості важких металів у неопластичній тканині молочної залози супроводжується зниженням ступеня диференціювання пухлини, зростанням рівня патологічної біомінералізації на 19 % та імунної запальної інфільтрації ( $p<0,05$ ), що виступають факторами прогресування злоякісного процесу.

22. Виявлено позитивний кореляційний зв'язок між накопиченням важких металів у тканині інфільтративного протокового раку молочної залози та експресією прогностично-несприятливих рецепторів пухлинною тканиною: p53 ( $r=0,31$ ,  $p<0,01$ ), Ki-67 ( $r=0,51$ ,  $p<0,01$ ), HER2/neu ( $r=0,36$ ,  $p<0,05$ ), MGMT ( $r=0,33$ ,  $p<0,05$ ), MMP1 ( $r=0,61$ ,  $p<0,01$ ), VEGF ( $r=0,59$ ,  $p<0,01$ ), OPN ( $r=0,43$ ,  $p<0,01$ ), hsp90 ( $r=0,27$ ,  $p<0,05$ ); та негативний кореляційний зв'язок з прогностично-сприятливими рецепторами пухлинної тканини: ER ( $r=-0,7$ ,  $p<0,01$ ), PR ( $r=-0,59$ ,  $p<0,01$ ) та Е-кадгерину ( $r=-0,32$ ,  $p<0,05$ ), що вказує на негативний вплив солей важких металів на рецепторний фенотип неопластичних клітин раку молочної залози. Також виявлено, що у пухлинній тканині жінок з групи «екологічно-забруднених» районів вищі показники ( $p<0,05$ ) експресії hsp90 $\alpha$  та менший рівень експресії рецепторів до стероїдних гормонів ( $p<0,05$ ), ніж у матеріалі від жінок, які проживають у незабруднених регіонах.

23. Підвищене накопичення Fe, Zn, Cu, Cr, Ni та Pb у пухлинній тканині впливає на генетичний матеріал клітин інфільтративного

протокового раку молочної залози, що проявляються у блокуванні транскрипції рецепторів, патологічному метилюванні ДНК та прогресуючому зростанні його фрагментації ( $p < 0,05$ ), що негативно відображається на перебігу злякисного процесу.

24. Важкі метали, накопичуючись у пухлинній тканині молочної залози, через внутрішньоклітинні посередники стимулюють процеси патологічної біомінералізації та васкуляризації, стабілізують прогностично-несприятливі протеїни, дестабілізують генетичний матеріал та блокують активність прогностично-сприятливих рецепторів, що призводить до прогресування канцерогенезу в молочній залозі.

## ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ

1. Кузенко Є.В. Запальні захворювання пародонта: патогенез та морфогенез: монографія / Є.В. Кузенко, А.М. Романюк; Сумський державний університет. – Суми: СумДУ, 2016. – 137 с..
2. Кузенко Є.В. Метилування ядерного матриксу фібробластів пародонта під впливом токсинів *staphylococcus haemolyticus* / Є.В. Кузенко, А.М. Романюк, Ю.В. Лахтін // Вісник проблем біології та медицини. – 2012. – Вип. 3, т. 2 (95). – С. 125–128.
3. Кузенко Є.В. Метилування ядерного матриксу фібробластів пародонта *in vitro* під впливом токсинів *Candida albicans* / Є.В. Кузенко, А.М. Романюк, Л.А. Шапошник // Загальна патологія та патологічна фізіологія. – 2012. – Т. 7, № 3. – С. 90–93.
4. Кузенко Є.В. Вплив несприятливих факторів довкілля (солі важких металів) на імунну систему / А.М. Романюк, М.М. Рудна, В.М. Рудна, Є.В. Кузенко // Вісник Сумського державного університету, серія «Медицина». – 2012. – № 2. – С. 36–41.
5. Кузенко Є.В. Генетичні аспекти розвитку зуба та тканин пародонта / А.М. Романюк, Є.В. Кузенко, Л.А. Шапошник // Світ медицини та біології. – 2012. – № 1 (32). – С. 22–26.
6. Kuzenko Y. Giant-cell epulis: immunohistochemical analysis of MGMT, p53, OPN and MMP-1 / Y. Kuzenko, A. Romanyuk // Osteologický bulletin. – 2013. – Vol. 18 (3). – С. 87–89.
7. Кузенко Е.В. Патогенез повреждения ДНК клеток пародонта при пародонтитах / Е.В. Кузенко, А.Н. Романюк, А.М. Политун, Р.А. Москаленко // Медицинские новости Грузии. – 2013. – № 4 (217). – С. 57–61.
8. Кузенко Є.В. Морфологічні зміни у тканинах пародонту при запаленні / Є.В. Кузенко, А.М. Романюк, Л.І. Карпенко // Український морфологічний альманах. – 2013. – Т. 11, № 2. – С. 58–60.
9. Кузенко Є.В. Морфологічні зміни та рівень експресії репаративного

ензиму Об-метилгуанін-ДНК-метилтрансферази у тканинах пародонта щурів під впливом *Candida albicans*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus aureus* та methylnitronitrosoguanidine / Є.В. Кузенко, А.М. Романюк // Новини стоматології. – 2013. – № 4 (77). – С. 88–92.

10. Кузенко Є.В. Біохімічні зміни крові під впливом Cr<sup>6+</sup> [Електронний ресурс] / Є.В. Кузенко, А.М. Романюк, Г.Ю. Бутко, О.В. Логвінова // Морфологія [Електронне видання]. – 2013. – Т. 7, № 4 3. – С. 78–82. – Режим доступу до ресурсу: [http://www.morphology.dp.ua/\\_pub/MORPHO-2013-07-03/13kevbus.pdf](http://www.morphology.dp.ua/_pub/MORPHO-2013-07-03/13kevbus.pdf)

11. Кузенко Є.В. Імунологічні аспекти впливу хрому / Є.В. Кузенко, А.М. Романюк, М.М. Рудна, О.І. Кузенко, М.А. Левкович // Український морфологічний альманах. – 2013. – Т. 11, № 3. – С. 12–15.

12. Kuzenko Y. Periodontitis and atherosclerosis: mechanisms of association through matrix metalloproteinase 1 expression / Y. Kuzenko, A. Romanyuk // Dental and Medical Problems. – 2014. – Vol. 51, № 2. – P. 23–26.

13. Kuzenko Y. Accumulation of Heavy Metals in Epulis / Y. Kuzenko, P. Antonina, L. Shaposhnyk, H. Logvinova, O. Hudymenko // Dental and Medical Problems. – 2014. – Vol. 51, № 3. – P. 375–381.

14. Kuzenko Y. Periodontal bone response under the influence of Cr (VI) / Y. Kuzenko, A. Romanyuk, A. Korobchanskaya, L. Karpenko // Osteologický bulletin. – 2014. – Vol. 19 (1). – P. 25–31.

15. Кузенко Є.В. Зміни ДНК тканин пародонту при запаленні / Є.В. Кузенко // Вісник проблем біології і медицини. – 2014. – Вип. 2, т. 1 (107). – С. 198–202.

16. Кузенко Є.В. Вивчення ДНК тканин пародонта щурів в умовах впливу Cr<sup>6+</sup> методом інфрачервоної спектрофотометрії / Є.В. Кузенко, А.М. Романюк, А.М. Політун // Питання експериментальної та клінічної медицини. – 2014. – № 2 (19). – С. 101–110.

17. Кузенко Є.В. Особливості експресії репаративного ензиму Об-метилгуанін-ДНК-метилтрансферази та пошкодження ДНК тканин пародонта



- при запаленні. Частина I / Є.В. Кузенко, А.М. Романюк, А.М. Політун // Новини стоматології. – 2014. – № 3 (80). – С. 46–50.
18. Кузенко Є.В. Особливості експресії репаративного ензиму Обметилгуанін-ДНК-метилтрансферази та пошкодження ДНК тканин пародонта при запаленні. Частина II / Є.В. Кузенко, А.М. Романюк, А.М. Політун // Новини стоматології. – 2014. – № 4 (81). – С. 21–24.
19. Кузенко Є.В. Оцінка стоматологічного статусу дітей з захворюваннями серцево-судинної системи та шлунково-кишкового тракту / Є.В. Кузенко, А.М. Романюк, О.І. Кузенко, О.В. Логвінова // Український стоматологічний альманах. – 2014. – № 5–6. – С. 23–27.
20. Kuzenko Y. T-lymphocytes and periodontal inflammation (short report) / Y. Kuzenko, A. Romanyuk, Y. Lindina, O. Hudymenko // Український морфологічний альманах. – 2014. – Т. 12, № 4. – С. 33–35.
21. Kuzenko Ye. Identification of epulis patients with a high risk of periodontal diseases: dna infrared spectra, expression mgmt and p53 by and apoptosis analysis / Ye. Kuzenko, A. Romaniuk // Експериментальна і клінічна медицина. – 2014. – № 2 (63). – Р. 91–101.
22. Kuzenko Y. Method: chemical and morphological studying of paraffin sections [Електронний ресурс] / Y. Kuzenko // Морфологія [Електронне видання]. – 2014. – Т. 8, № 2. – С. 89–92. – Режим доступу до ресурсу: [http://www.morphology.dp.ua/\\_pub/MORPHO-2014-08-02/14kevdpz.pdf](http://www.morphology.dp.ua/_pub/MORPHO-2014-08-02/14kevdpz.pdf)
23. Кузенко Є.В. Ріст і формоутворення нижньої щелепи і зубів в умовах впливу солей важких металів / А.М. Романюк, А.Б. Коробчанська, Є.В. Кузенко, О.О. Терещенко, С.А. Романюк // Здобутки клінічної і експериментальної медицини. - 2014. - № 2 (21). - С. 151-153.
24. Kuzenko Y. S100, bcl2 and myeloperoxid protein expressions during periodontal inflammation [Електронний ресурс] / Y. Kuzenko, A. Romanyuk, A. Politun, L. Karpenko // BMC Oral Health [Електронне видання]. – 2015. – Vol. 15:93. – Режим доступу до ресурсу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4527225/>

25. Kuzenko Y. Odontogenic Inflammation Complicated by an Abscess of the Brain: / Y. Kuzenko, A. Romanyuk // *Dental and Medical Problems*. – 2015. – Vol. 52, № 2. – P. 235–240.
26. Kuzenko Y. Mechanisms of morphogenetic disorders in the lower jaw under the influence of heavy metal salts on the body / Y. Kuzenko, A. Romaniuk, A. Korobchanska, M. Lyndin // *Interventional medicine and applied science*. – 2015. – Vol. 7 (2). – P. 49–52.
27. Kuzenko Y. Cellular microenvironment and collagen destruction during periodont inflammation [Електронний ресурс] / Y. Kuzenko, O. Diachenko, O. Kuzenko, O. Olishkevych // *Морфологія [Електронне видання]*. – 2015. – Т. 9, № 4. – P. 43–48. – Режим доступу до ресурсу: [http://www.morphology.dp.ua/\\_pub/MORPHO-2015-09-04/15kevksz.pdf](http://www.morphology.dp.ua/_pub/MORPHO-2015-09-04/15kevksz.pdf)
28. Kuzenko Y. Immunohistochemical study of p53 and ki-67 expression in gingival / Y. Kuzenko, A. Politun, M. Lyndin // «Гофунговские чтения» : науч.-практ. конф. с междунар. участием, г. Харьков, 10 февраля 2015 г. : материалы конф. / Вопросы экспериментальной и клинической стоматологии: сб. науч. тр. – 2015. – № 11, ч. 1. – С. 288–292.
29. Кузенко Є.В. Спосіб виділення дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК) з парафінових гістологічних блоків : пат. на корисну модель 108736 Україна: МПК С12N 15/10 (2006.01) / Є.В. Кузенко, А.М. Романюк, М.С. Линдін. – № u201601435 ; заявл. 17.02.16 ; опубл. 25.07.16, Бюл. № 14. – 2 с.
30. Кузенко Є.В. Експресія hsp90aa1 шапірону при запаленні тканин пародонту / Є.В. Кузенко, О.О. Гудименко // *Здобутки теоретичної медицини – в практику охорони здоров'я : Всеукраїнська наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів, м. Запоріжжя, 26–27 березня 2015 р. : матеріали конф.* – Запоріжжя, 2014. – С. 94.
31. Kuzenko Y. Myeloperoxid, S100 and bcl2 expirations during periodontal inflammation / Y. Kuzenko, A. Romanyuk, A. Politun, L. Karpenko // *Теоретичні та практичні проблеми розвитку сучасної медицини : міжнар. наук.-практ. конф., м. Одеса, 03–04 квітня 2015 р. : матеріали конф.* – Одеса,

Південноукраїнська медична наукова організація, 2015. – С. 79.

32. Кузенко Є.В. Гени розвитку, формування та дозрівання тканин пародонта / Є.В. Кузенко // Актуальні питання теоретичної медицини: наук.-практ. конф. студентів, молодих вчених, лікарів та викладачів, присв. 20-річчю заснування медичного інституту м. Суми, 10–12 квітня 2012 р. : матеріали конф. – Суми, 2012. – С. 315.

33. Kuzenko Y. Periodontal changes under the influence of Cr6+, study by infrared spectrophotometry / Y. Kuzenko, A. Romanyuk, H. Logvinova, H. Korobchanska // Актуальні питання теоретичної та практичної медицини : II Міжнар. наук.-практ. конф. студентів та молодих вчених, м. Суми, 16–18 квітня 2014 р. : матеріали конф. – Суми, 2014. – С. 314.

34. Kuzenko Y. Periodontal disease and atherosclerosis: mechanisms of association through MMP-1 expression / Y. Kuzenko // Актуальні питання сучасної медицини : XI Міжнар. наук. конф. студентів та молодих вчених, м. Харків, 17–18 квітня 2014 р. : матеріали конф. – Харків, 2014. – С. 208.

35. Кузенко Є.В. Експресія білка S100 і CD68 в остеоблатокластомі / Є.В. Кузенко, О.О. Дяченко // Актуальні питання теоретичної та практичної медицини : III Міжнар. наук.-практ. конф. студентів та молодих вчених, м. Суми, 23–24 квітня 2015 р. : матеріали конф. – Суми, 2015. – С. 398.

36. Kuzenko Y. Damage of the DNA in periodontal cells and expression enzyme Ob-methyluanin-DNA methyltransferase during inflammation / Y. Kuzenko, A. Romanyuk, H. Logvinova // Актуальные вопросы патологической анатомии в мирное и военное время : Всероссийская конф., посвящённая 155-летию кафедры патологической анатомии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, г. Санкт-Петербург, 18 апреля 2014 г. : материалы конф. – Санкт-Петербург, 2014. – С. 300.

37. Кузенко Є.В. Механізм формування гігантоклітинного епулісу / Є.В. Кузенко // Інноваційні технології в стоматології : VII наук.-практ. конф., м. Тернопіль, 26 вересня 2015 р. : матеріали конф. – Тернопіль, 2015. –

C. 159.

38. Кузенко Є.В. Особливості експресії репаративного ензиму Об-метилгуанін-ДНК-метилтрансферази та пошкодження ДНК тканин пародонта при запаленні / Є.В. Кузенко // Міжнародні стандарти профілактики та лікування і їх впровадження в практику лікаря-стоматолога : III Національний український стоматологічний конгрес, м. Київ, 22–23 жовтня 2015 р. : матеріали конгресу. – Київ, 2015. – С. 98.

39. Кузенко Є.В. Дослідження каскадних гнійно-септичних ускладнень одонтогенного походження у щелепно-лицевій ділянці / Є.В. Кузенко, І.О. Денисенко, А.В. Ажар, Л.З. Поскарк, О.П. Кузів // Міжнародні стандарти профілактики та лікування і їх впровадження в практику лікаря-стоматолога : III Національний український стоматологічний конгрес, м. Київ, 22–23 жовтня 2015 р. : матеріали конгресу. – Київ, 2015. – С. 98.

40. Kuzenko Y. Macrophage in periodontal inflammation / Y. Kuzenko, A. Romanyuk, A. Politun // Journal of Stomatology. 2016. – Том. 69 № 5. - P. 674-679.

41. Москаленко Р.А. Спосіб підготовки зразків біологічних тканин для скануючої електронної мікроскопії при проведенні експериментальних та клінічних досліджень : пат. на корисну модель 117929 Україна: МПК G01N 1/28 10 (2006.01) / Р.А. Москаленко Є.В. Кузенко, Л.Г Голобородько А.М. Романюк. – № u 201701502 ; заявл. 17.02.2017; опубл. 10.07.17, Бюл. № 13. – 3 с.

42. Lyndin M. Pathogenetic mechanisms of heavy metals effect on proapoptotic and proliferative potential of breast cancer / A. Romaniuk, M. Lyndin, R. Moskalenko, Ye. Kuzenko, O. Gladchenko, Yu. Lyndina // Interventional Medicine & Applied Science. – 2015. – Vol. 7 (2). – P.63–67. (Здобувачем проведено імуногістохімічне дослідження препаратів, електрофорез ДНК, оброблено результати дослідження, сформульовано висновки).

43. Lyndin M. Immune microenvironment as a factor of breast cancer

progression / A. Romaniuk, M. Lyndin // *Diagnostic Pathology*. – 2015. – Vol. 10 (79). – DOI 10.1186/s13000-015-0316-y.

44. Линдін М.С. Дослідження рецепторів естрогену, прогестерону та her-2/neu в тканині раку молочної залози в умовах впливу солей важких металів / А.М. Романюк, М.С. Линдін, Р.А. Москаленко, А.В. Золотарьова // *Журнал клінічних та експериментальних медичних досліджень*. – 2014. – №2 (2). – С. 168–175.

45. Линдін М.С. Морфологія біомінералізаторів у тканині раку молочної залози та експресія рецепторів остеопонтину / А.М. Романюк, М.С. Линдін, Р.А. Москаленко, О.М. Гортинська // *Клінічна та експериментальна медицина*. – 2014. – №3 (64). – С. 121–123.

46. Линдін М.С. Морфологічні та біохімічні особливості раку молочної залози в умовах забруднення довкілля солями важких металів / А.М. Романюк, М.С. Линдін, Р.А. Москаленко, Є.В. Кузенко // *Вісник проблем і медицини*. – 2014. – №1 (113). – С. 318–322.

47. Линдін М.С. Вплив запальної інфільтрації на експресію рецепторів hsp90α в тканині раку молочної залози / А.М. Романюк, М.С. Линдін, Л.І. Карпенко, А.Ю. Будко, Ю.М. Линдіна, О.В. Логвінова // *Журнал клінічних та експериментальних медичних досліджень*. – 2015. – №3 (1). – С. 38–43.

48. Линдін М.С. Механізми впливу солей важких металів на біомінералізацію тканини раку молочної залози / А.М. Романюк, М.С. Линдін // *Матеріали XV конгресу Світової Федерації Українських Лікарських Товариств (Чернівці, 16–18 жовтня 2014 р.) / Українські медичні вісті*. – 2014. – Т. 11 (1-4). – С. 435.

49. Линдин Н.С. Влияние микроэлементоза на экспрессию рецепторов тканью рака молочной железы / А.Н. Романюк, Н.С. Линдин, Р.А. Москаленко, А.Ю. Будко // *Актуальные вопросы патологической анатомии в мирное и военное время: сборник научных трудов Всероссийской конференции, посвященной 155-летию кафедры патологической анатомии ВМедА им. С.М. Кирова (Санкт-Петербург, 18 апреля 2014 г.)*. – СПб. :

ВМедА, 2014. – С. 193–195.

50. Линдін М.С. Визначення експресії металопротеїнази 1 та Е-кадгерину як факторів метастазування злоякісних пухлин молочної залози / М.С. Линдін, А.М. Романюк, Л.І. Карпенко, Н.А. Шутка // Актуальні питання теоретичної та практичної медицини: збірник тез доповідей II Міжнародної науково-практичної конференції студентів та молодих вчених (Суми, 16–18 квітня 2014 р.). – Суми : СумДУ, 2014. – С. 155–156. (Здобувачем проведено імуногістохімічне дослідження препаратів, оброблено результати дослідження, сформульовано висновки).

51. Линдін М.С. Залежність експресії рецепторів p53 та Ki-67 від ступеня злоякісності інфільтруючих форм раку молочної / М.С. Линдін // Актуальні питання сучасної медицини: збірник тез XI Міжнародної наукової конференції студентів та молодих вчених (Харків, 17–18 квітня 2014 р.). – Харків : ХНУ імені В.Н. Каразіна, 2014. – С. 93.

52. Линдін М.С. Особливості запального інфільтрату в тканині раку молочної залози / М.С. Линдін // Актуальні питання сучасної медицини: збірник тез XII Міжнародної наукової конференції студентів та молодих вчених (Харків, 15–16 квітня 2015 р.). – Харків : ХНУ імені В.Н. Каразіна, 2015. – С. 133.

53. Линдін М.С. Експресія шаперону 90 $\alpha$  тканиною раку молочної залози / М.С. Линдін // Актуальні питання теоретичної та клінічної медицини: збірник тез доповідей Міжнародної науково-практичної конференції студентів та молодих вчених (Суми, 23–24 квітня 2015 р.). – Суми : СумДУ, 2015. — С. 221.

54. Линдін М.С. Порушення регуляції апоптозу при прогресуванні інфільтративного протокового раку молочної залози / М.С. Линдін, М.В. Мірошніченко // Актуальні питання теоретичної та клінічної медицини: збірник тез доповідей Міжнародної науково-практичної конференції студентів та молодих вчених (Суми, 23–24 квітня 2015 р.). – Суми : СумДУ, 2015. – С. 222. (Здобувачем проведено імуногістохімічне дослідження

препаратів, оброблено результати дослідження, сформульовано висновки).

55. Линдін М.С. Патогенетичні зміни в тканині раку молочної залози в умовах ендogenous мікроелементозу / М.С. Линдін // Здобутки теоретичної медицини – в практику охорони здоров'я: матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених та студентів (Запоріжжя, 26–27 березня 2015 р.). – Запоріжжя, 2014. – С. 21.

56. Линдін М.С. Вплив імунного мікрооточення на експресію рецепторів тканиною раку молочної залози / М.С. Линдін // Морфологічні дослідження – виклики сучасності: збірник тез доповідей науково-практичної конференції (Суми, 23–24 квітня 2015 р.). – Суми : СумДУ, 2015 – С. 62–63.

57. Линдін М.С. Гістологічні та молекулярно-генетичні особливості інфільтративного протокового раку молочної залози в умовах забруднення довкілля солями важких металів / А.М. Романюк, М.С. Линдін // Актуальні проблеми сучасної патоморфології та патофізіології: матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю, присвяченої 50-річчю кафедри патологічної анатомії та кафедри патофізіології Запорізького державного медичного університету (Запоріжжя, 28–29 травня 2015 р.). – Запоріжжя, 2015. – С. 69. (Здобувачем проведено дослідження пухлинної тканини, оброблено результати дослідження, сформульовано висновки).

58. Резнік А.В. Кальцифікація щитоподібної залози: поширення, патологія, механізми виникнення та діагностичне значення (огляд літератури) / А.М. Романюк, Р.А. Москаленко, А.В. Резнік, А.В. Гапченко // Журнал клінічних та експериментальних медичних досліджень. – 2014. – Т. 2, № 4. – С. 417–426.

59. Резнік А.В. Морфологічне дослідження щитоподібної залози при захворюваннях, які супроводжуються біомінералізацією / Р.А. Москаленко, А.В. Резнік, А.В. Гапченко, А.Г. Прокоп'єва, А.С. Мальцева // Вісник проблем біології і медицини. – 2015. – Вип. 2, Т. 3 (120). – С. 324–331. (Здобувачем виготовлено гістологічні препарати, оброблено результати

дослідження, сформульовано висновки).

60. Резнік А.В. Ультразвукове ехо біомінералізації щитоподібної залози / А.В. Резнік, А.В. Гапченко, В.В. Гапченко, М.П. Старків, Р.А. Москаленко // Журнал клінічних та експериментальних медичних досліджень. – 2015. – Т. 3 (2). – С. 188–198. (Здобувачем виготовлено гістологічні препарати, оброблено результати дослідження, сформульовано висновки).

61. Резнік А.В. Аналіз захворюваності на злоякісні пухлини щитоподібної залози у Сумській області / А.В. Резнік, В.А. Сміянов, С.В. Тарасенко, Ю.В. Москаленко, В.А. Лукаш // Журнал клінічних та експериментальних медичних досліджень. – 2015. – Т. 3, № 4. – С. 609–617.

62. Резник А.В. Структура и морфология нанокристаллических кальцификатов щитовидной железы / С.Н. Данильченко, А.С. Станиславов, В.Н. Кузнецов, А.В. Коченко, Т.Г. Калиниченко, А.В. Резник, В.В. Стариков, Р.А. Москаленко, А.Н. Романюк // Журнал нано- та електронної фізики. – 2016. – Т. 8, № 1. – С. 01031-1–01031-6.

63. Резнік А.В. Папілярний рак з біомінералізацією: клініко-морфологічні особливості / Р.А. Москаленко, А.М. Романюк, А.В. Резнік, А.В. Курочкін, А.М. Піддубний, В.А. Лукаш // Патологія. – 2016. – №1 (36). – С. 29–36.

64. Резнік А.В. Імуногістохімічне дослідження папілярного раку щитоподібної залози з біомінералізацією / А.В. Резнік, Р.А. Москаленко, А.М. Романюк // Журнал клінічних та експериментальних медичних досліджень. – 2016. – Т. 4, № 2. – С. 341–351.

65. Резнік А.В. Патологічна біомінералізація при патології щитоподібної залози / А.М. Романюк, Р.А. Москаленко, А.В. Резнік, В.А. Лукаш, С.О. Мостова // Український морфологічний альманах. – 2013. – Т. 16, № 3 (додаток). – С. 212.

66. Reznik A.V. Association between osteopontin expression and thyroid disease biomineralization / A.V. Reznik, R.A. Moskalenko, M.A. Reznik // Folia medica Cassoviensia. – 2014. – Tomus 69, No. 1, Suppl. 1. – P. 112.



67. Резнік А.В. Дослідження експресії рецепторів білків p53 та Ki67 у тканині щитоподібної залози з біомінералізацією / А.М. Романюк, Р.А. Москаленко, Л.І. Карпенко, А.В. Резнік, А.В. Гапченко // Актуальні питання теоретичної та практичної медицини: збірник тез доповідей III Міжнародної науково-практичної конференції студентів та молодих вчених, м. Суми, 23–24 квітня 2015 р. – Суми : СумДУ, 2015. – С. 226–227.