

УДК 616-006.04-006.2  
УКПП  
№ держреєстрації № 0117U003937  
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  
e-mail: info@sci.sumdu.edu.ua

ЗАТВЕРДЖУЮ  
Проректор з наукової роботи  
д-р. фіз.-мат. наук, професор

\_\_\_\_\_ Чорноус А.М.

ЗВІТ  
ПРО НАУКОВО-ДОСЛІДНУ РОБОТУ  
Розробка методу діагностики пухлин органів репродуктивної системи з  
використанням молекул клітинної адгезії раково-ембріонального антигену  
ОТРИМАННЯ ЗРАЗКІВ БІОЛОГІЧНОЇ РІДИНИ ТА АУТОПСІЙНОГО  
МАТЕРІАЛУ  
(проміжний)

Начальник НДЧ  
канд. фіз - мат. наук, снс

Д.І. Курбатов

Науковий керівник  
канд.мед наук, доцент

Р.А. Москаленко

2018

Рукопис закінчено 25 грудня 2018 р.  
Результати роботи розглянуто науковою радою СумДУ, протокол від 27  
листопада 2018 р. № 5.

## СПИСОК АВТОРІВ

Керівник НДР, гол.наук. співроб., канд.мед. наук	_____ (25.12.2018)	Москаленко Роман Андрійович (розділи 1,2,3)
Ст.наук. співроб., канд. мед. н	_____ (25.12.2018)	Линдін Микола Сергійович (розділ 2,3)
Молодший наук. співроб.	_____ (25.12.2018)	Піддубний Артем Михайлович (розділ 2)
Мол.наук. співроб.	_____ (25.12.2018)	Линдіна Юлія Миколаївна (розділ 2)
Лаборант	_____ (25.12.2018)	Мірошніченко Марина Володимирівна (розділ 3)
Лаборант	_____ (25.12.2018)	Палій Тарас Володимирович (розділ 2)
Лаборант	_____ (25.12.2018)	Гирявенко Дмитро Романович (розділ 1)
Лаборант	_____ (25.12.2018)	Панченко Володимир Дмитрович (розділ 1)
Лаборант	_____ (25.12.2018)	Кругляк Галина Миколаївна (розділ 1)
Лаборант	_____ (25.12.2018)	Гирявенко Наталія Іванівна (розділ 1)
Лаборант	_____ (25.12.2018)	Матвеев О.О. (розділ 3)

## РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 42 с., 13 рис., 2 табл., 33 джерел.

ІМУНОГІСТОХІМІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ, МАТКОВА ТРУБА, МАТКА, ПРОСТАТА, БАКТЕРІОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ.

Об'єкт дослідження – злоякісні пухлини органів репродуктивної системи людини.

Предмет досліджень – особливості морфогенезу злоякісних пухлин органів репродуктивної системи, гістологічна характеристика неопластичних процесів та їх імунофенотип, взаємозв'язок між показниками імуноферментного аналізу біологічних рідин та рецепторним профілем пухлинної тканини.

Мета роботи – оптимізація морфологічної діагностики перебігу злоякісних пухлин органів репродуктивної системи на різних етапах розвитку шляхом дослідження різних молекул адгезії раково-ембріонального антигену у біологічних рідинах та неопластичній тканині, встановлення їх участі в ініціюванні та прогресуванні ракових процесів.

Для досягнення поставленої мети були визначені такі завдання:

- забрати матеріал у осіб без патології органів репродуктивної системи при біопсійному та аутопсійному дослідженні тканин;
- встановити склад мікробіоти у зазначених об'єктах;
- проаналізувати результати бактеріального та імуноферментного аналізу, дослідити кореляційні зв'язки між зазначеними показниками.

Методи дослідження – гістологічне, імуногістохімічне дослідження інтактної та пухлинної тканини передміхурової залози, матки та маткових труб, бактеріологічне дослідження передміхурової залози, математичні методи. Дослідження спрямовані на отримання даних про імунофенотип пухлин та їх варіабельність при неопластичній трансформації, особливостей мікробної контамінації тканини та їх вплив на перебіг патологічних процесів.

## ЗМІСТ

Вступ-----	5
1 Дослідження епідеміологічних та морфологічних особливостей злоякісних пухлин тіла матки-----	7
2 Встановлення прогностичного значення експресії VEGF у тканині серозної аденокарциноми маткових труб-----	14
3 Залежність імунофенотипу раку передміхурової залози з інтралюмінальними включеннями від його ступеню диференціації-----	18
4 Узагальнення отриманих результатів-----	29
5 Висновки-----	37
Перелік джерел посилання-----	39

## ВСТУП

Дисгормональні та пухлинні процеси у матці є актуальною проблемою сучасної медицини. На фоні покращення діагностично-лікувальних заходів в онкологічній службі і досі залишається невирішене питання щодо особливостей прогнозування перебігу раку тіла матки, яка займає третє місце серед злякисних пухлин геніталій у жінок [1]. Найбільш поширеною епітеліальною неоплазією даної локалізації (75-80%) є ендометріодна аденокарцинома (ЕА), яка має значний метастатичний потенціал [2]. Не зважаючи на наявний у більшості випадків позитивний терапевтичний ефект після гістеректомії, у всьому світі відзначається велика летальність з приводу аденокарциноми ендометрію (4%) [3]. У більшості випадків це пов'язано з лімфогенним та гематогенним поширенням пухлини [4]. У зв'язку з цим останнім часом значної актуальності набуло питання особливостей васкуляризації (ангіогенезу) неопластичної тканини та її участі у прогресуванні злякисного процесу.

Не зважаючи на значний прогрес у вивченні злякисних новоутворень, первинний рак маткових труб (ПРМТ) залишається маловивченим захворюванням [5]. Причини його виникнення, частота, можливості діагностики, профілактики та лікування до сьогодні є проблемними та актуальними. На сучасному етапі доведено, що цей вид неоплазії в практичній онкогінекології спостерігається значно частіше і є першоджерелом пухлин яєчників та очеревини [6-8]. Показники виживання у більшості досліджень характеризують ПРМТ як пухлину з несприятливим прогнозом – 5-річна виживаність коливається від 35 до 56% [9,10].

Ангіогенез є однією з прогностичних ознак пухлинного мікрооточення. У свою чергу найбільш вивченим ангіогенним фактором є фактору росту ендотелію судин (VEGF). Ряд досліджень вказують на можливість використання рівня експресії VEGF в якості маркера прогнозу при

злоякісних новоутвореннях легень, молочної залози, передміхурової залози, кишківника [11–14]. Білки VEGF зв'язуються на поверхні ендотеліальних клітин з рецепторами, які виникають під дією речовин, що виробляє сама пухлина, ініціюючи цілий каскад біохімічних процесів. Відбувається інтенсивний поділ ендотеліоцитів, що відіграє важливу роль у зростанні і поширенні ракових клітин. Надекспресія VEGF визначає точку прикладання для нових таргетних лікарських засобів – блокаторів ангіогенезу [15,16].

Рак передміхурової залози (РПЗ) є однією з найбільш частих причин онкологічної смерті чоловіків по всьому світу. За даними Американського товариства раку, у 2016 році в США було зареєстровано 186 890 нових випадків РПЗ та 26 120 смертей [17]. Розвиток та прогресія РПЗ тісно пов'язані з наявністю хронічного запалення, асоційованого з присутністю інтралюмінальних включень (простатоліти та амілоїдні тільця, або *corpora amylacea*) [18]. Перебіг та прогноз злоякісного процесу має пряму залежність від ступеню диференціювання пухлинної тканини. Для оцінки морфологічного статусу РПЗ загальноприйнятою є шкала Глісона [19]. Відомо, що зі зниженням ступеню диференціювання РПЗ погіршується прогноз захворювання та значно збільшується вірогідність метастазування, переважно з ураженням кісткової тканини [20].

Білки теплового шоку, зокрема HSP90, складають до 1-2% всіх цитозольних білків, що знаходяться в клітинах еукаріот. До основних його функцій належить АТФ-залежне ремоделювання молекул білків у клітинах як еукаріот, так і прокаріот, внутрішньоклітинний транспорт та передача сигналів, участь у деградації білків та виступає в якості захисного білка. Їх синтез відбувається не лише під час впливу стресових факторів, забезпечуючи їх значний вплив на фізіологічне функціонування клітини. У клітинах бактерій, зокрема *E. coli*, білки теплового шоку виявляються у цитоплазмі, периплазмі та мембрані, де їх концентрація є найвищою. Також численні дослідження встановили *E. coli* як етіологічний фактор розвитку хронічного бактеріального простатиту у 50-80% чоловіків.

## **1. ДОСЛІДЖЕННЯ ЕПІДЕМІОЛОГІЧНИХ ТА МОРФОЛОГІЧНИХ ОСОБЛИВОСТЕЙ ЗЛОЯКІСНИХ ПУХЛИН ТІЛА МАТКИ**

При гістологічному дослідженні біопсійного та післяопераційного матеріалу доволі важко оцінити ступінь васкуляризації тканини у зв'язку з відсутністю можливості верифікації капілярів та диференціації судин на кровоносні та лімфатичні. Саме тому використання іммуногістохімічних досліджень з визначенням специфічних патернів у тканинах набули значної актуальності у наукових дослідженнях. Експресія рецепторів до CD31 є переконливим свідченням наявності ендотелію, а, відповідно, і судин у досліджуваних зразках. Цей білок приймає участь у формуванні міжендотеліальних з'єднань, міграції імуніцитів, ангіогенезі, виживаності клітин і т.д.. Рівень мікрovasкулярної щільності (шляхом визначення рецепторів до CD31) коливається у залежності від виду тканини та гістологічного типу пухлини. Наявність рецепторів до подопланіну виявлено у значній кількості тканин, але основною його функцією, яку використовують у морфологічних дослідженнях, є участь у функціонуванні ендотеліоцитів лімфатичних судин. Саме тому, визначення його експресії використовується у дослідженнях, які присвячені вивченню особливостей ангіогенезу (у т.ч. і лімфангіогенезу) різного виду тканин.

Епідеміологічні особливості поширення злоякісних пухлин матки серед жінок України та Сумської області вивчено на підставі аналізу звітів канцерреєстру за період з 2011 по 2017 роки при Сумському обласному клінічному онкологічному диспансері (СОКОД). Морфологічні особливості ендометріальних анаплазій визначено на підставі аналізу звітної документації патолого-анатомічного відділення СОКОД.

Гістологічний тип та ступінь злоякісності неопластичної тканини визначали на зрізах пухлин, забарвлених гематоксиліном та еозином за стандартною методикою. Отримані результати знайшли своє відображення у розподілі аденокарцином за FIGO на 1, 2 та 3 ступені (Grade 1,2,3).

Закономірності васкуляризації ендометріальної тканини проведено шляхом імуногістохімічного дослідження препаратів до рецепторів CD31 (ендотеліальний маркер, розведення 1:50) та подопланіну (лімфендотеліальний маркер, розведення 1:300). У якості інгібіторів ендогенної пероксидази, блокаторів неспецифічної імунної реакції, вторинних антитіл, посилювачів індикації взаємодії антиген-антитіло та візуалізації рецепторів використано систему детекції «UltraVision Quanto Detection System HRP DAB Chromogen» («Thermo scientific», США). Як негативний (використання замість первинних антитіл фосфатного буфера), так і позитивний (забарвлення раніше досліджуваних рецепторно-позитивних тканин) контроль використано для перевірки якості імуногістохімічних реакцій.

Мікрovasкулярну щільність у досліджуваних зразках визначали шляхом підрахунку кількості CD31-позитивних патернів (поодинокі або кластерні клітинні утворення) у попередньо отриманих зображеннях тканини. Наявність подопланін-позитивних структур слугувало індикатором присутності лімфатичних судин в аналізованому матеріалі.

Мікроскопічне дослідження проводилося за допомогою мікроскопа «Carl Zeiss Primo Star», оснащеного цифровою камерою «Zeiss AxioCam ERs 5s» та програмним забезпеченням «ZEN 2 (blue edition)», з отриманням зображень при окулярі x10, об'єктиві x10 площею 1,24 мм<sup>2</sup> та окулярі x10, об'єктиві x40 – 0,06 мм<sup>2</sup>. Оцінку вірогідності розбіжностей порівнюваних показників проводили з використанням t-критерію Стьюдента, взаємозв'язок між параметрами оцінювали згідно критерію кореляції Пірсона (r). Результати вважали статистично достовірними при ступеню вірогідності більше 95% (p<0,05).

Аналізуючи статистичні дані канцерреєстру у період з 2011 по 2017 роки (рис. 1.1) встановлено, що захворюваність на злоякісні пухлини, як в Україні, так і у Сумській області знаходиться на стабільно високому рівні (332,6±21,8 та 415±9,6 випадків на 100 тис. населення (в.н.100т.н.)



відповідно). Контингент же хворих за звітний період становить  $2302,1 \pm 72,5$  по Україні та  $2771,3 \pm 205,9$  в.н.100т.н. по Сумській області.

Серед них неоплазії тіла матки посідають 3 місце (після злоякісних пухлин молочної залози та шкіри), складаючи  $29,4 \pm 1,5$  та  $35,9 \pm 4,3$  в.н.100т.н. відповідно. У віковому аспекті виявлено, що пік захворюваності припадає на 55-69 (59%) років та має загальну тенденцію на всій території держави. Дорічна летальність у жінок в Україні та Сумській області, яким встановлено діагноз злоякісна пухлина тіла матки, становить  $9,2 \pm 1,9\%$  та  $8,9 \pm 1,1\%$ . Питома вага онкохворих, які прожили 5 та більше років після встановлення діагнозу становить  $67,1 \pm 0,7\%$  та  $65,3 \pm 1,4\%$  відповідно. Виявлено, що смертність від карцином тіла матки за звітний період у середньому по Україні становить  $7,7 \pm 0,59$  в.н.100т.н., у Сумській області цей показник складає  $9,51 \pm 1,57$ .

Аналізуючи дані гістологічного дослідження при СОКОД, виявлено, що найбільш поширеним гістологічним варіантом злоякісних неоплазій у Сумській області є ЕА (рис. 1.2) різного ступеня злоякісності (81,5%). Серед них високодиференційовані неоплазії виявлено у 20%, помірнодиференційовані – у 72% та низькодиференційовані – у 8%.

Серед інших варіантів пухлин у 2,5% спостерігаються світлоклітинна і серозна та у 5% муциозна аденокарциноми (Рис. 1.2). У 6,4% діагностовано змішану злоякісну пухлину мезенхімально-епітеліального походження (гомологічну карциносаркому). Плоскоклітинний рак, ендометріальну саркому та лейоміосаркому виявлено у поодиноких випадках.

З метою виключення впливу гістологічного варіанту пухлини на результати подальших досліджень ступінь васкуляризації вивчено на зразках ЕА.

У результаті дослідження препаратів встановлено, що нормальна тканина ендометрію у залежності від фази менструального циклу жінок має певні закономірності васкуляризації та представлена різним ступенем компактності спіральними артеріями та тонкостінними венами.

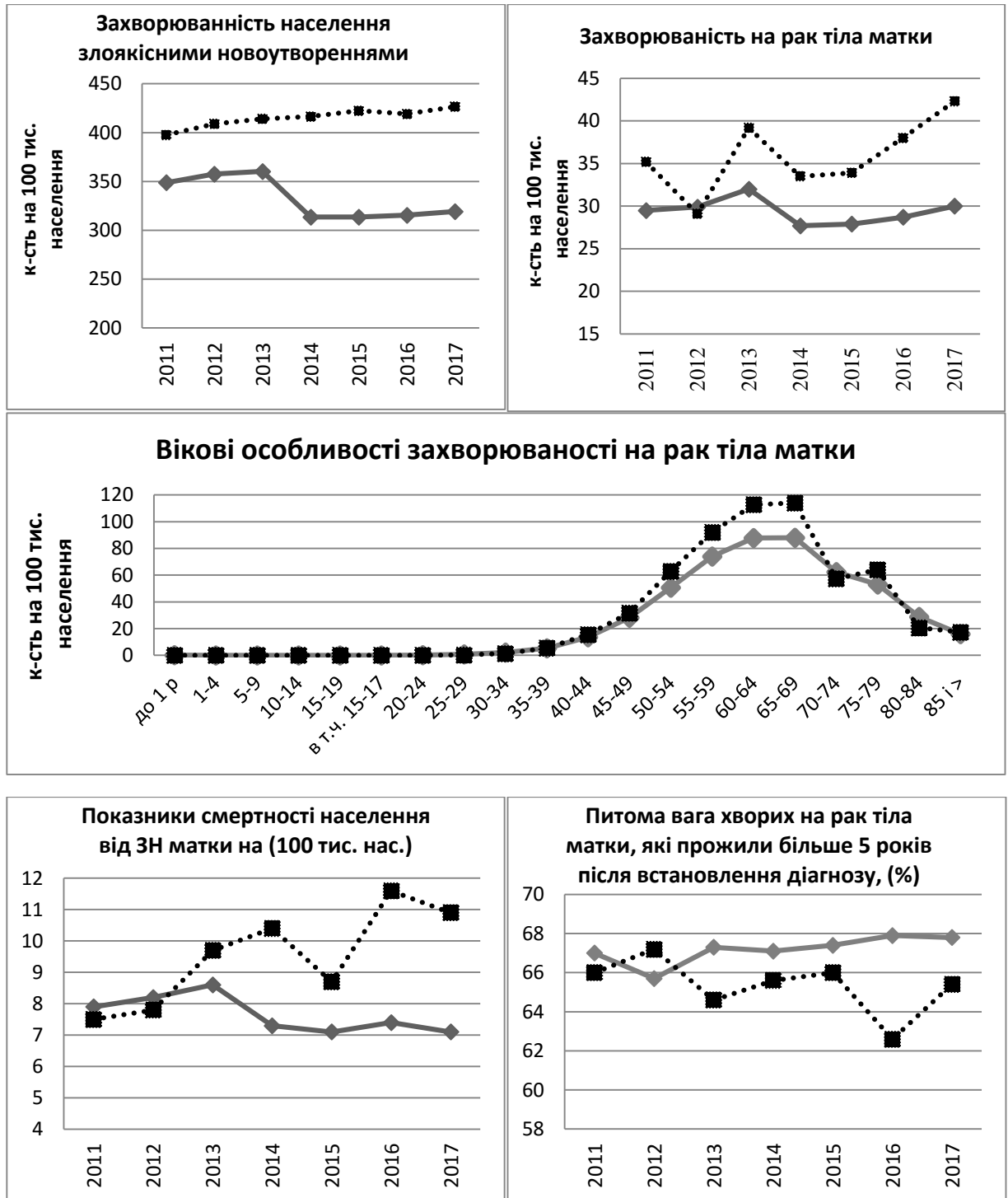


Рисунок 1.1 – Захворюваність населення України (—◆—) та Сумської області (··■··) на злякисні пухлини.

Гіперплазована тканина ендометрію у значній мірі зберігає ці особливості, хоча у деяких полях зору виявлено, як зростання кількості судин, так і аваскуляризовані ділянки. У неопластичній тканині наявний варіабельний розподіл судин, як серед паренхіматозного компоненту

пухлини, так і в оточуючій стромі, які представлені артеріями, венами та поодинокими дрібними судинами (артеріоли та венули).

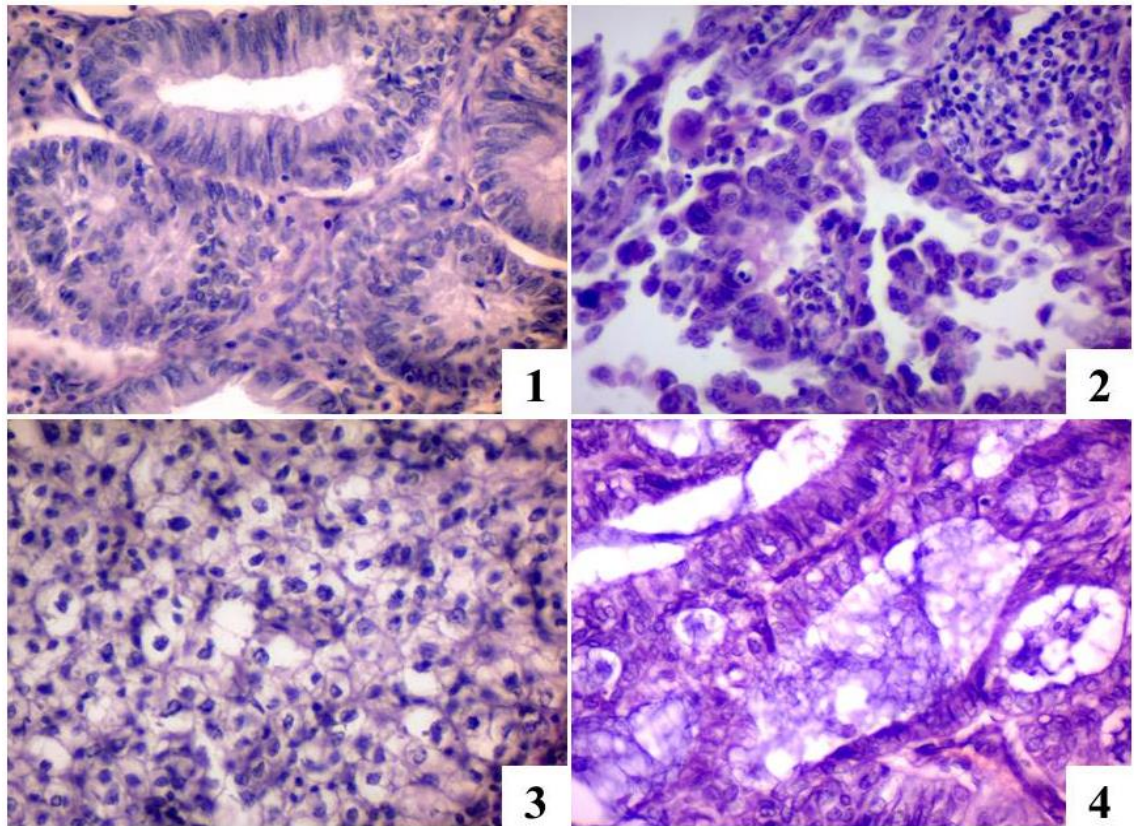


Рисунок 1.2 – Гістологічні варіанти аденокарциноми тіла матки. 1 – ендометріоїдна, 2 – серозна, 3 – світлоклітинна та 4 – муциозна аденокарциноми. Забарвлення гематоксиліном та еозином, збільшення x100.

Більш детально ступінь васкуляризації вивчено при імуногістохімічному дослідженні рецепторів до CD31 (рис. 1.3). Встановлено, що всі ендотеліальні клітини мають цитоплазматичну експресію даного білка.

CD31-позитивні клітини виявлено, як у судинах, які було візуалізовано при гістологічному дослідженні, так і у дрібних, інколи щілиноподібних утвореннях (капілярах), непомітних при забарвленні гематоксиліном та еозином. Серед паренхіматозної складової карцином спостерігаються відокремлені клітини з інтенсивною цитоплазматичною експресією

рецепторів до CD31. Вони також розцінені нами як мікроваскулярні утворення, які знаходяться на стадії утворення повноцінної судинної мережі.

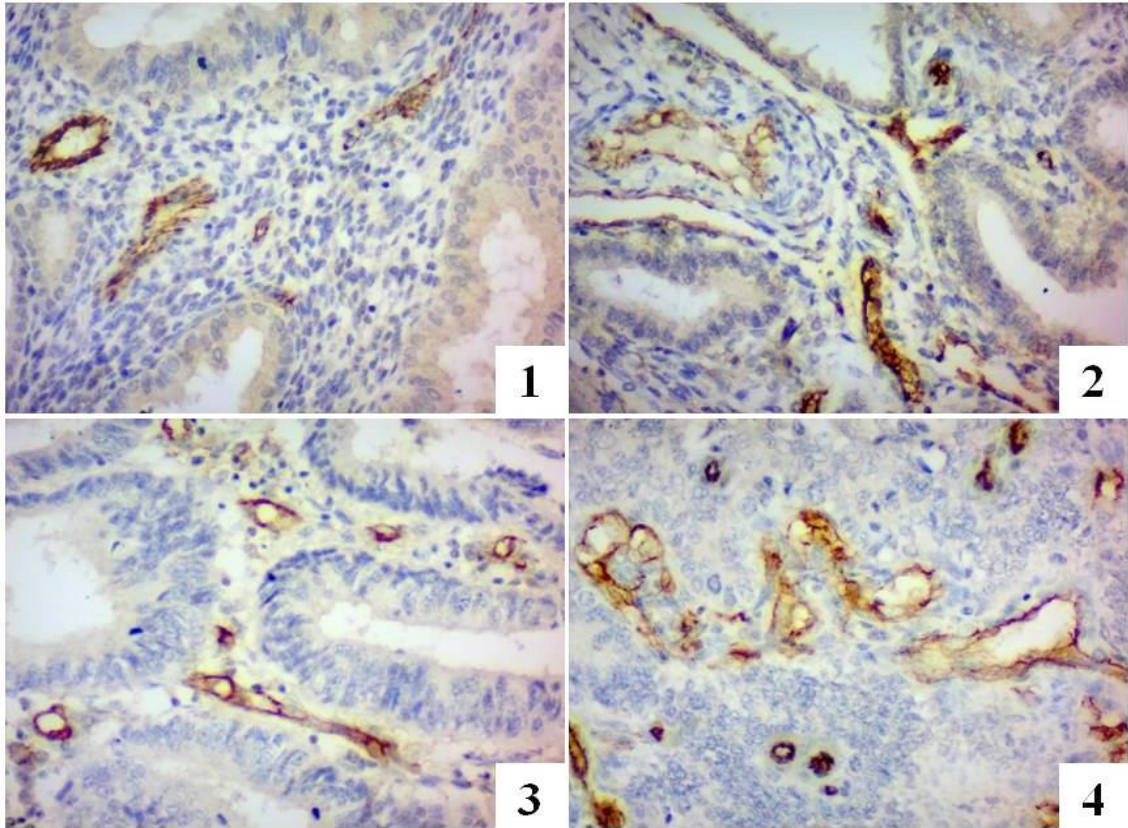


Рисунок 1.3 – Тканина ендометрію. Норма (1), залозиста гіперплазія (2), високодиференційована (3) та низькодиференційована (4) аденокарцинома. Імуногістохімічне дослідження рецепторів до CD31, збільшення x400.

У неопластичній тканині ендометрію виявлено більшу щільність капіляризації (мікроваскуляризації), у порівнянні з нормою (рис. 1.3-1). Окрім цього, ступінь судинної щільності напряму залежав від ступеню катаплазії пухлини (рис. 1.3-3,4) – збільшення кількості мікросудинних утворень при зростанні злоякісності неопластичної тканини ( $p < 0,05$ ). Нами виявлено також посилення васкуляризації гіперплазованої ендометріальної тканини (рис. 1.3-2), у порівнянні з нормою, але вона представлена в основному не капілярами, як це виявлено у пухлинах, а у більшості випадків артеріями та венами.

Імуногістохімічне дослідження рецепторів до подопланіну дозволило візуалізувати поодинокі розкидані лімфатичні судини у нормальній та гіперплазованій тканині ендометрію за рахунок експресії білка у цитоплазмі лімфендотеліальних клітин (рис. 1.4-1,2).

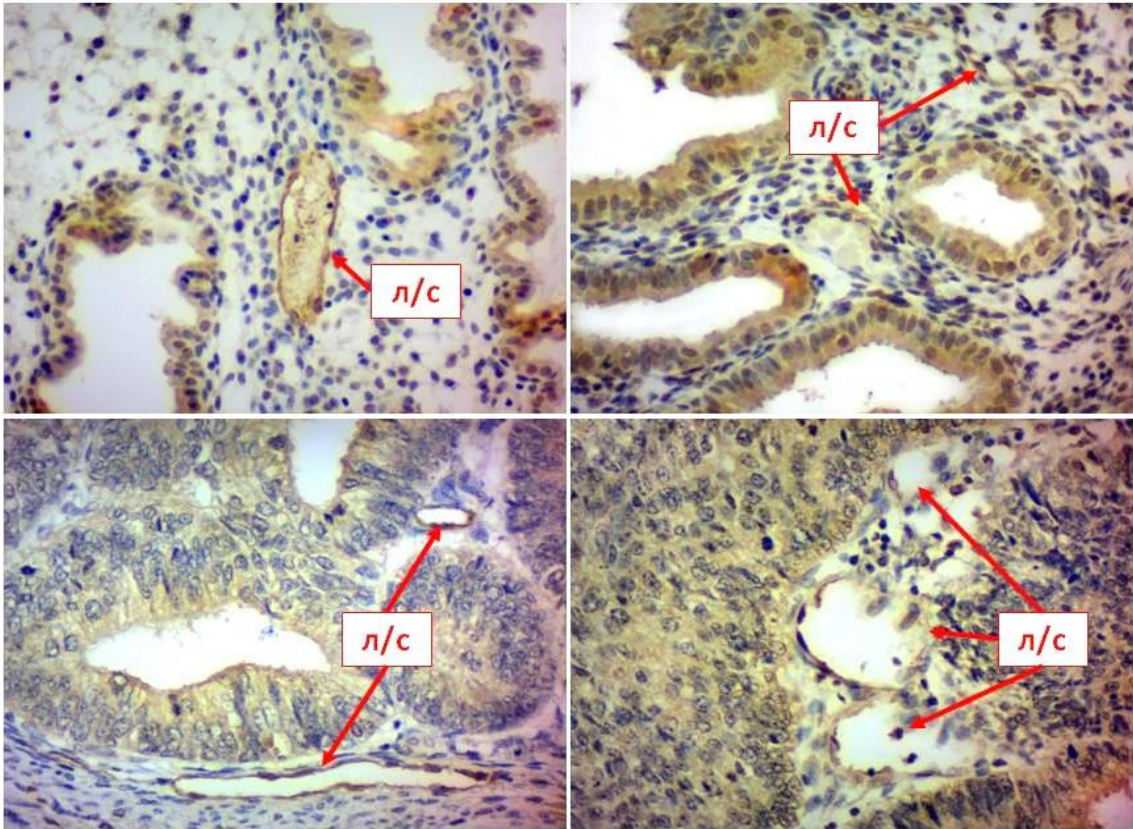


Рисунок 1.4 – Тканина ендометрію. Норма (1), залозиста гіперплазія (2), високодиференційована (3) та низькодиференційована (4) аденокарцинома. л/с – лімфатична судина. Імуногістохімічне дослідження рецепторів до подопланіну, збільшення x400.

Встановлено зростання кількості подопланін-позитивних утворень у неопластичній тканині (рис. 1.4-3,4) з одночасним зростанням кількості лімфатичних судин при прогресуванні пухлини ( $p < 0,05$ ).

Слід зазначити, що у препаратах, окрім судинних утворень, виявлено CD31-позитивні патерни у поодинокі розкиданих імуніцитах (лімфоцити, макрофаги) та поодинокі подопланін-позитивні клітини (стромальні та залозисті клітини ендометрію).

## **2. ВСТАНОВЛЕННЯ ПРОГНОСТИЧНОГО ЗНАЧЕННЯ ЕКСПРЕСІЇ VEGF У ТКАНИНІ СЕРОЗНОЇ АДЕНОКАРЦИНОМИ МАТКОВИХ ТРУБ**

Основу морфологічного та імуногістохімічного досліджень роботи склав операційний матеріал, отриманий від 66 пацієток з САкМТ, прооперованих у спеціалізованих лікувальних закладах м.Суми та м.Харкова. Визначення первинності ураження МТ проводилося на підставі критеріїв:

- 1) основний осередок пухлини локалізується у МТ і поширюється з ендосальпінксу;
- 2) візуалізується межа інтактного й ураженого пухлиною епітелію труби;
- 3) яєчник та матка є інтактними, а при залученні їх в пухлинний процес МТ вміщує більше неопластичної тканини;
- 4) відсутні злякисні новоутворення інших локалізацій.

Під світловим мікроскопом зрізи досліджували для виявлення загальної морфологічної картини та ступеню гістологічної злякисності, поширення пухлини (ступінь інвазії в стінку МТ з акцентом на наявність пухлинних клітин у кровоносних і/або лімфатичних судинах, поширення на тазові органи), наявності метастазів у регіонарних лімфатичних вузлах.

Для встановлення аутогенної стимуляції ангиогенезу вивчали експресію рецепторів VEGF з використанням поліклональних кролячих антитіл (розведення 1:200). Для визначення експресії рецепторів стероїдних гормонів використовували кролячі моноклональні антитіла до естрогену (клон SP1, розведення 1:400) та прогестерону (клон YR85, розведення 1:400). Для оцінювання проліферативної активності пухлинних клітин використовували кролячі моноклональні антитіла до білка Ki-67 (клон SP6, розведення 1:500). Для вивчення особливостей апоптозу і порушення в системі репарації ДНК ракових клітин використано мишачі моноклональні антитіла до рецепторів bcl-2 (клон 100/D5, розведення 1:100) та p53 (клон SP5, розведення 1:300).

Рівень експресії VEGF оцінювали напівкількісним шляхом (від 0 до 3 балів), згідно якої 0 балів свідчить про відсутність цитоплазматичної експресії VEGF, 1 бал – слабе цитоплазматичне забарвлення менше, ніж у 10% клітин, 2 бали – слабка чи помірна експресія в 10–50% клітин, 3 бали – виражена та помірна експресія більш ніж у 50% клітин.

Цитоплазматична експресія VEGF виявлялася безпосередньо, як в пухлинних клітинах, так і в ендотелії судин (рис. 2.1).

У 58 досліджених випадках (87,9%) була виявлена помірна або сильна цитоплазматична реакція в ендотеліальних клітинах та більш, ніж у 70% пухлинних клітин, які розташовувалися дифузно у всіх полях зору.

Пухлини зі слабкою та помірною вогнищевою експресією 10–50% неопластичних клітин, яким були притаманні також негативно пофарбовані зони, склали 6 (9,1%) випадків. Фокальна слабка цитоплазматична реакція, яка була наявною менше, ніж у 10% пухлинних клітин та в ендотелії поодиноких судин спостерігалася у 2 випадках (3%).

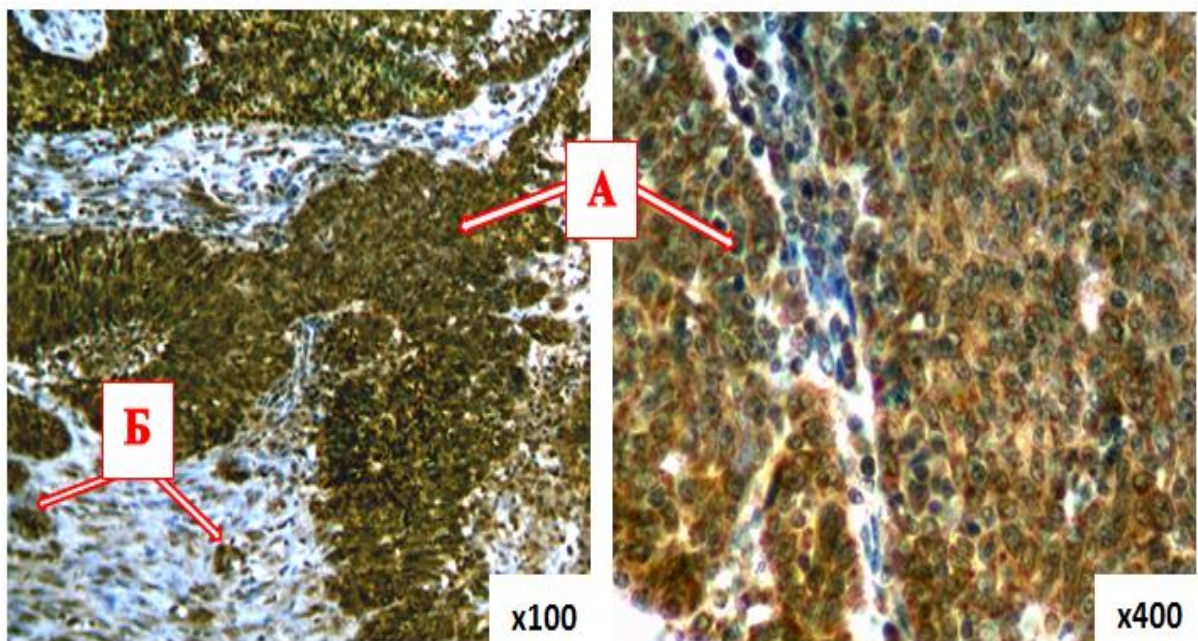


Рисунок 2.1 – САкМТ низької диференціації. Виражена цитоплазматична експресія VEGF. А – у пухлинних клітинах; Б – в ендотелії судин.

ІГХ дослідження експресії VEGF. Зб.  $\times 100$ ,  $\times 400$ .

Рівень експресії VEGF не залежав від віку та менопаузального статусу жінок ( $p > 0,05$ ). Присутній кореляційний зв'язок між показниками ангиогенезу та ступенем диференціювання неоплазії ( $r = 0,24$ ,  $p < 0,05$ ). Так, при порівнянні рівня експресії VEGF у пухлинах різного ступеня диференціювання встановлено, що із його зниженням рівень експресії VEGF збільшувався та складав  $2,4 \pm 0,7$  балів у G<sub>1</sub>-пухлинах та  $2,8 \pm 0,1$  бали у G<sub>2</sub>-пухлинах. Серед САкМТ найвищий рівень експресії VEGF спостерігався в низькодиференційованих пухлинах та становив у всіх випадках 3 бали, що свідчить про те, що всі G<sub>3</sub>-пухлини мають вищу вираженість ангиогенезу.

Нами також встановлено взаємозв'язок між експресією VEGF та клінічною стадією захворювання ( $r = 0,21$ ,  $p < 0,05$ ). Крім того, всі випадки метастазування у регіональних лімфатичних вузлах супроводжувалися високою експресією рецепторів VEGF. (табл.1).

Таблиця 2.1 – Експресія VEGF у САкМТ залежно від розповсюдженості процесу, наявності метастазів та ступеня диференціювання неоплазії

Критерії оцінки		Кількість випадків VEGF-позитивних пухлин			
		0	1 бал	2 бали	3 бали
Стадія хвороби за класифікацією FIGO	I (n=23)	–	1	6	16
	II (n=16)	–	1	–	15
	III (n=27)	–	–	–	27
Наявність ураження регіональних лімфатичних вузлів	N <sub>0</sub> (n=47)	–	2	6	39
	N <sub>1</sub> (n=19)	–	–	–	19
Ступінь диференціювання пухлини	G <sub>1</sub> (n=10)	–	1	4	5
	G <sub>2</sub> (n=23)	–	1	2	20
	G <sub>3</sub> (n=33)	–	–	–	33



При порівнянні результатів імуногістохімічного дослідження стосовно виявлення рецепторів ангиогенезу з іншими маркерами встановлено наявність негативного зв'язку з рівнем експресії ER ( $r=-0,25$ ,  $p<0,05$ ), PR ( $r=-0,22$ ,  $p<0,05$ ). Виявлено слабкий кореляційний зв'язок між експресією VEGF та p53 ( $r=0,25$ ,  $p<0,05$ ). Статистично достовірного взаємозв'язку між експресією рецепторів VEGF та наявністю рецепторів до Ki-67 та bcl-2 не виявлено ( $p>0,05$ ).

### 3. ЗАЛЕЖНІСТЬ ІМУНОФЕНОТИПУ РАКУ ПЕРЕДМІХУРОВОЇ ЗАЛОЗИ З ІНТРАЛЮМІНАЛЬНИМИ ВКЛЮЧЕННЯМИ ВІД ЙОГО СТУПЕНЮ ДИФЕРЕНЦІАЦІЇ

Дослідження проводилося на біопсійному матеріалі, отриманому під час проведених операцій на базі Сумської обласної клінічної лікарні та Сумської міської клінічної лікарні №1. Для дослідження були відібрані зразки тканин раку передміхурової залози з наявністю та відсутністю інтралюмінальних включень (простатоліти, corpora amylacea). Всього було вивчено 30 зразків РПЗ з включеннями (експериментальна група, Е) та 30 зразків РПЗ без них (контрольна група, К). Контрольна та експериментальна групи були розділені на 2 підгрупи в залежності від ступеню злоякісності, котрий був визначений за шкалою Глісона на пухлини з помірним (К2 та Е2) та низьким (К3 та Е3) ступенем диференціації. До групи помірнодиференційованих пухлин відносилися РПЗ 7-8 ступеня за шкалою Глісона (2-4 клас), до низькодиференційованих – 9-10 ступеня за шкалою Глісона (5 клас) [3].

Проведене дослідження було схвалене етичним комітетом Медичного інституту СумДУ (протокол №3/6 від 07.06.2016 р.).

Для гістологічного дослідження біологічний матеріал фіксували у 10% розчині нейтрального буферного формаліну впродовж 24 годин. У подальшому матеріал зневоднювали і просочували парафіном в апараті карусельного типу «АТМ-4М» (Україна). На ротаційному мікротомі Shandon Finnesse 325 (Thermo Scientific) виконували парафінові серійні зрізи товщиною  $4 \times 10^{-6}$  м.

Серійні зрізи товщиною  $4 \times 10^{-6}$  м, виготовлені з підготовлених гістологічних парафінових блоків, наносили на адгезивні скельця SuperFrost (Thermo Scientific) і висушували за температури  $37^{\circ}\text{C}$  упродовж 18 годин. Депарафінізовані зрізи підлягали демаскуванню антигенів термічним

методом шляхом нагрівання зрізів у цитратному буфері (рН 6,0) за температури 95–98°C. У дослідженнях використана така панель антитіл («Thermo Scientific», США): рецептори до андрогену (AR), проапоптотичний білок p53 (p53), матриксна метало-протеїназа 1 (MMP1), судинний ендотеліальний фактор росту (VEGF), білок теплового шоку 86 кДа (Hsp90), білок теплового шоку 70 кДа (Hsp70), CD68, проапоптотичний протеїн Вах та остеонектин (OSN) (табл. 3.1).

Таблиця 3.1 – Панель антитіл для імуногістохімічного дослідження

Антитіло	Імунізована тварина	Клон	Розведення	Патерн експресії
AR	Кролик	Поліклон	1:200	Ядро
p53	Миша	SP5	1:100	Ядро
MMP1	Кролик	Поліклон	1:50	Цитоплазма
VEGF	Кролик	Поліклон	1:200	Цитоплазма та мембрана
Hsp90	Кролик	Поліклон	1:100	Ядро та цитоплазма
Hsp70	Кролик	Поліклон	1:100	Ядро та цитоплазма
Вах	Кролик	Поліклон	1:100	Цитоплазма
CD68	Миша	KP1	1:100	Цитоплазма
OSN	Кролик	Поліклон	1:50	Цитоплазма

Проведення морфометричних досліджень складових елементів мікропрепаратів проводили за допомогою морфометричної програми «SEO Scan ICX 285 AK-F IEE-1394» (Україна) та програми “Zen 2.0” (Німеччина). У середовищі зазначених програм за допомогою морфометричних інструментів виділяли круглі поля зору діаметром 1 000 мкм, всередині яких підраховувалася кількість імунопозитивно забарвлених клітин. Отримання та зберігання знімків препаратів проводили за допомогою цифрової системи виведення зображення «SEO Scan ICX 285 AK-F IEE-1394» (Україна) та «ZEN» для мікроскопів «Carl Zeiss» (Німеччина).

В якості контролю якості проведеного ІГХ дослідження проводили активний (використання тканини, з попередньо встановленою позитивною та негативною реакцією) та пасивний контроль отриманих результатів.

Отримані дані перевіряли на нормальний розподіл за критерієм Шапіро-Уїлка. У разі ненормального розподілу використовували непараметричний метод – тест Мана-Уїтні. У випадку правильного розподілу дані порівнювалися за допомогою параметричного t-критерію Стьюдента для визначення достовірності різниці. Результати вважали статистично достовірними при ступеню вірогідності більше 95% ( $p < 0,05$ ). Графічне відображення результатів статистичного аналізу було виконане за допомогою програми GraphPad Prism 7.04.

У роботі проводилося морфологічне порівняння зразків пухлинної тканини з помірним та низьким ступенем диференціювання для обох досліджуваних груп. Гістологічний аналіз тканини РПЗ експериментальної групи з помірним ступенем диференціювання (E2) показав присутність залоз, сформованих атипovими клітинами з гіперхромними ядрами, формуванням криброзних та псевдотрабекулярних структур, між пухлинними залозами спостерігався добре розвинутий стромальний компонент. Деякі з пухлинних залоз відокремлювалися та мали вигляд ланцюга. Більшість залоз мала просвіт.

Тканина зразків РПЗ групи E3 характеризувалася значним порушенням гістоархітекtonіки за рахунок спрощення будови пухлинних залоз, які формували множинні ланцюги та гнізда, мали незначну кількість стромального компоненту. Більшість залоз не мали просвіту, часто зразки даної групи були представлені виключно пухлинним полем.

Зразки експериментальної групи (E2 та E3) характеризувалися наявністю внутрішньопросвітних включень в пухлинних залозах. Ці включення мали вигляд округлих утворень, які повторювали форму просвіту залози. Для простатолітів був характерний темно-коричневий колір та більш гомогенна структура. *Corpora amylacea* мали шарувату будову та темно-рожевий колір.

Для тканин зразків експериментальної та контрольної групи була характерна наявність запальної інфільтрації навколо пухлинних залоз. Проте,

вираженість запального процесу була більшою для експериментальної групи. Запальний інфільтрат складався переважно з клітин макрофагального ряду, лімфоцитів та нейтрофілів.

Імуногістохімічне дослідження експресії рецепторів андрогену у тканині РПЗ підгруп E2 та E3 показало виразну ядерну реакцію у пухлинних клітинах карциноми та поодиноких клітинах навколопухлинної стромы. Кількість позитивних клітин для підгрупи E2 відповідало  $396.79 \pm 26.02$ , для підгрупи E3  $360.91 \pm 36.87$  пухлинних клітин у полі зору. Кількість позитивно-збарвлених ядер для зразків підгруп K2 та K3 становило  $417.17 \pm 39.61$  та  $424.88 \pm 53.76$  клітин в полі зору відповідно (Рис. 3.1-3.2).

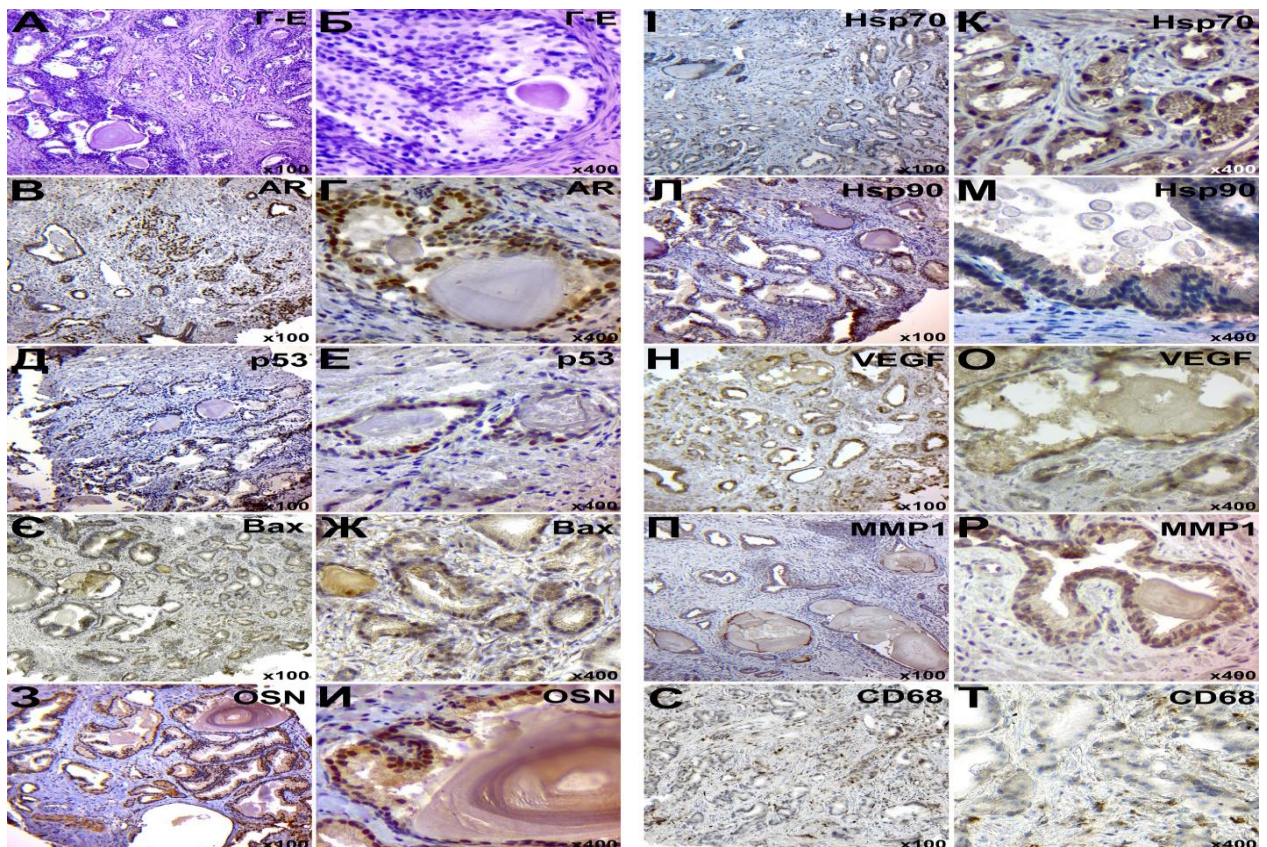


Рисунок 3.1 – Імуногістохімічне дослідження тканини РПЗ експериментальної групи, помірного ступеня диференціації (E2): А–Б – забарвлення гематоксиліном та еозином; В–Г – ІГХ виявлення AR; Д–Е – ІГХ ідентифікація білка p53; Є–Ж – ІГХ виявлення білка Vax; З–И – ІГХ дослідження експресії OSN; І–К – ІГХ виявлення білка Hsp70; Л–М – ІГХ виявлення білка Hsp90; Н–О – ІГХ індикація VEGF; П–Р – ІГХ виявлення MMP1; С–Т – ІГХ ідентифікація CD68. Хромоген – діамінобензидин, додаткове контрастування ядер гематоксиліном Майєра. Збільшення вказане в правому нижньому куті кожного зображення.

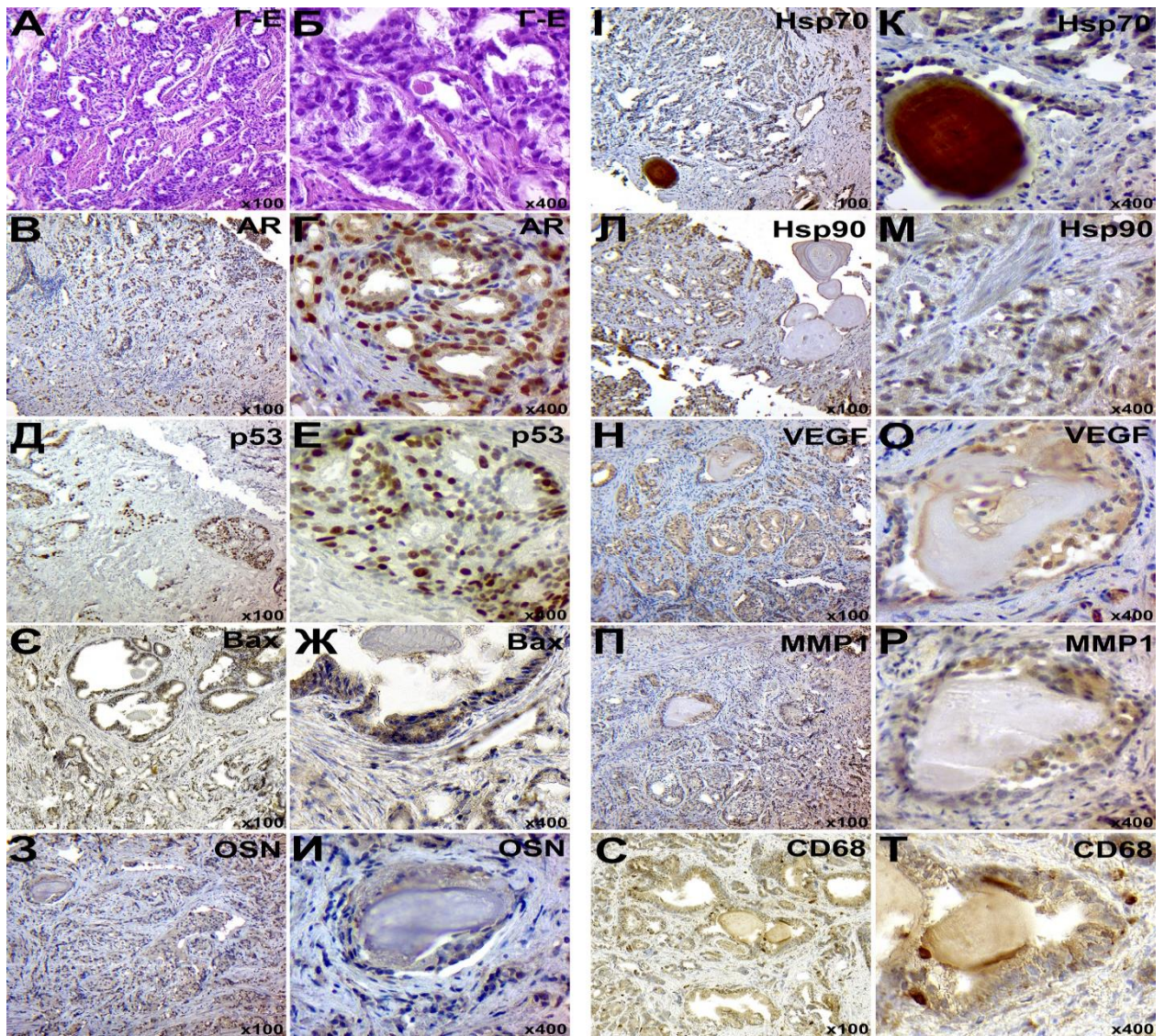


Рисунок 3.2 – Імуногістохімічне дослідження тканини РПЗ експериментальної групи, низького ступеня диференціації (Е3): А–Б – забарвлення гематоксиліном та еозином; В–Г – ІГХ виявлення AR; Д–Е – ІГХ ідентифікація білка p53; Є–Ж – ІГХ виявлення білка Bax; З–И – ІГХ дослідження експресії OSN; І–К – ІГХ виявлення білка Hsp70; Л–М – ІГХ виявлення білка Hsp90; Н–О – ІГХ індикація VEGF; П–Р – ІГХ виявлення MMP1; С–Т – ІГХ ідентифікація CD68. Хромоген – діамінобензидин, додаткове контрастування ядер гематоксиліном Майєра. Збільшення вказане в правому нижньому куті кожного зображення.

Рівень експресії проапоптотичного p53-протеїну у зразках пухлинної тканини підгруп Е2 та Е3 становив  $33.09 \pm 3.3$  та  $46.7 \pm 2.15$  клітин в полі зору відповідно. Забарвлення мало ядерний характер, позитивні клітини були розміщені переважно невеликими групами. У РПЗ підгруп К2 та К3 було

виявлено  $30.49 \pm 2.96$  та  $42.48 \pm 3.36$  пухлинних клітин в полі зору відповідно (Рис. 3.3-3.4).

Інший проапоптотичний білок Вах мав цитоплазматичний характер експресії та помірну інтенсивність сигналу. У зразках пухлин підгрупи Е2 було ідентифіковано  $65.18 \pm 3.53$  позитивних клітин, а у підгрупі Е3 –  $58.05 \pm 3.79$ . Рівні експресії вах у підгрупах К2 та К3 відповідали  $42.69 \pm 3.64$  та  $46.54 \pm 4.68$  пухлинним клітинам у полі зору.

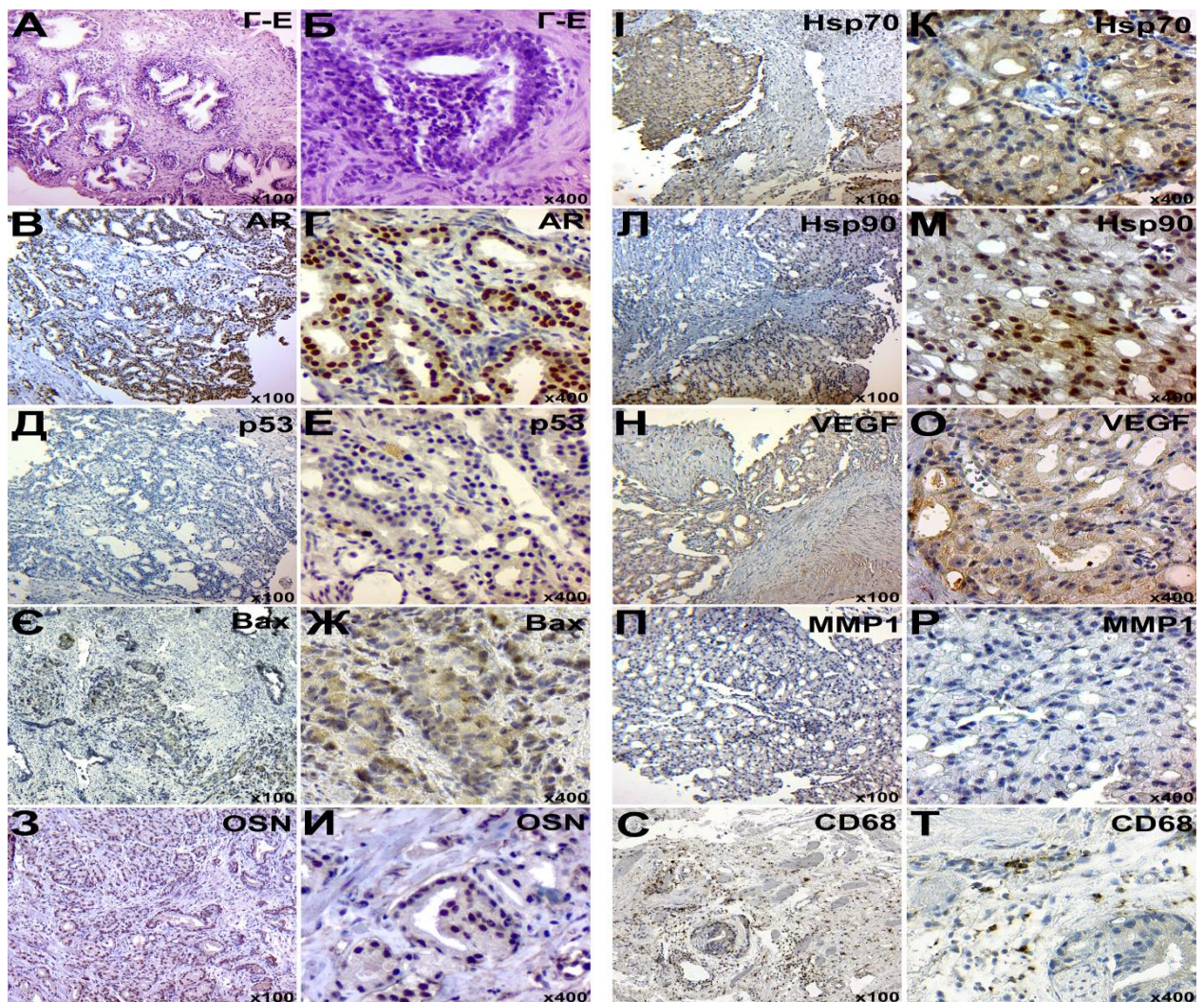


Рисунок 3.3 – Імуногістохімічне дослідження тканини РПЗ контрольної групи, помірного ступеня диференціації (К2): А–Б – забарвлення гематоксиліном та еозином; В–Г – ІГХ виявлення AR; Д–Е – ІГХ ідентифікація білка p53; Є–Ж – ІГХ виявлення білка Вах; З–И – ІГХ дослідження експресії OSN; І–К – ІГХ виявлення білка Hsp70; Л–М – ІГХ виявлення білка Hsp90; Н–О – ІГХ індикація VEGF; П–Р – ІГХ виявлення MMP1; С–Т – ІГХ ідентифікація CD68. Хромоген – діамінобензидин, додаткове контрастування ядер гематоксиліном Майєра. Збільшення вказане в правому нижньому куті кожного зображення.

Білок теплового шоку Hsp70 мав змішаний ядерно-цитоплазматичний характер візуалізації. Кількість Hsp70-позитивних пухлинних елементів у підгрупі E2 становила  $325,57 \pm 20,53$ , для підгрупи E3 –  $298,56 \pm 17,19$  клітин в полі зору. Рівень позитивно-зabarвлених пухлинних клітин у підгрупі K2 становив  $274,73 \pm 32,72$ , для підгрупи K3 цей показник складав  $260,72 \pm 17,7$ .

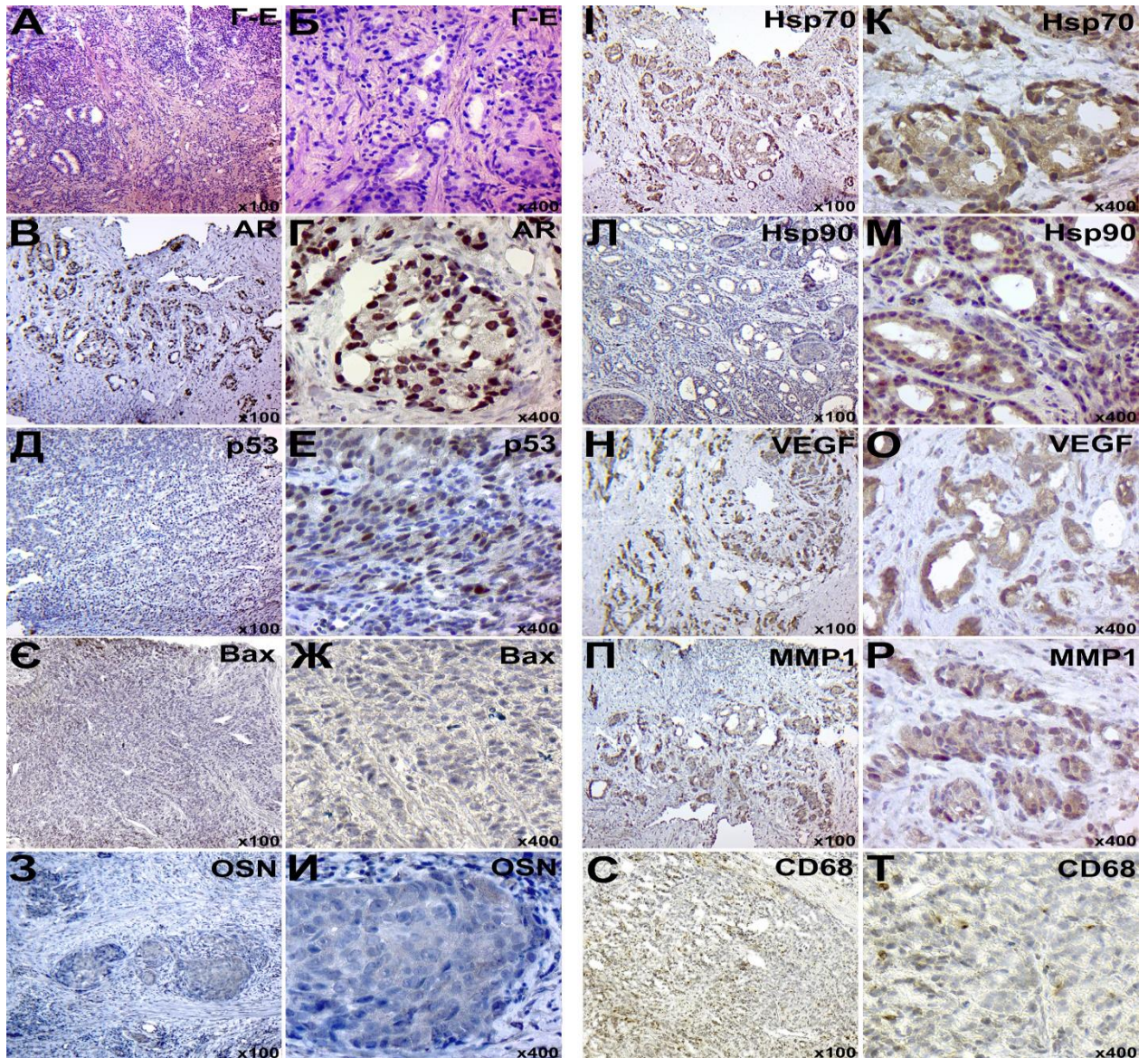


Рисунок 3.4 – Імуногістохімічне дослідження тканини РПЗ контрольної групи, низького ступеня диференціації (K3): А–Б – забарвлення гематоксиліном та еозином; В–Г – ІГХ виявлення AR; Д–Е – ІГХ ідентифікація білка p53; Є–Ж – ІГХ виявлення білка Vax; З–И – ІГХ дослідження експресії OSN; І–К – ІГХ виявлення білка Hsp70; Л–М – ІГХ виявлення білка Hsp90; Н–О – ІГХ індикація VEGF; П–Р – ІГХ виявлення MMP1; С–Т – ІГХ ідентифікація CD68. Хромоген – діамінобензидин, додаткове контрастування ядер гематоксиліном Майєра. Збільшення вказане в правому нижньому куті кожного зображення.



Під час імуногістохімічного дослідження білка теплового шоку Hsp90 була виявлена його експресія в ядрі та цитоплазмі неопластичних клітин. Кількість позитивно-забарвлених елементів у підгрупах E2 та E3 становила  $352.84 \pm 26.39$  та  $331.28 \pm 28.5$  відповідно. Для підгруп K2 та K3 ці показники відповідали значенням  $413.3 \pm 39.66$  та  $454.98 \pm 17.42$  клітин в полі зору. Також виявлена його присутність між шарами сохрога amyloasea та застійному секреті залоз.

Оцінка експресії ендотеліального фактору росту вказувало на цитоплазматичний характер реакції у вигляді зерен та грудочок. У підгрупах E2 та E3 кількість VEGF-позитивних пухлинних клітин становила  $50.65 \pm 3.91$  та  $50.97 \pm 2.86$ . Пухлинна тканина підгруп K2 та K3 містила в середньому  $68.84 \pm 4.8$  та  $54.08 \pm 2.09$  позитивних неопластичних клітин у полі зору відповідно.

Білок матриксна металопротеїназа 1 був виявлений у вигляді дифузного цитоплазматичного забарвлення. MMP1 експресувався як пухлинними клітинами, так і елементами стромального компонента. Кількість позитивних пухлинних клітин у тканині підгруп E2 та E3 складала  $32,49 \pm 1,6$  та  $43,92 \pm 1,82$  відповідно. У підгрупах K2 та K3 було виявлено  $32,54 \pm 2,46$  та  $41,13 \pm 2,45$  MMP1-позитивних клітин відповідно.

Маркер клітин макрофагального ряду CD68 мав цитоплазматичний характер експресії. У пухлинній тканині та навколопухлинній стромі зразків підгруп E2 та E3 було виявлено  $138.11 \pm 5.57$  та  $136.86 \pm 4.05$  CD68-позитивних клітин в полі зору. Для підгруп K2 та K3 цей показник становив  $85.6 \pm 5.22$  та  $98.7 \pm 6.09$  позитивних клітин відповідно.

Глікопротеїн OSN був виявлений у вигляді дифузної цитоплазматичної реакції в пухлинних клітинах. Рівень його експресії у підгрупах E2 та E3 складав  $102.03 \pm 5.05$  та  $53.11 \pm 4.59$  позитивних пухлинних клітин в полі зору відповідно. Підгрупи K2 та K3 мали  $43.1 \pm 3.44$  та  $30.5 \pm 2.88$  OSN-позитивних неопластичних клітин.

#### 4. ЕКСПРЕСІЯ HSP 90 ПРИ ХРОНІЧНОМУ БАКТЕРІАЛЬНОМУ ПРОСТАТИТІ З АМІЛОЇДНИМИ ТІЛЬЦЯМИ

Зрізи зі стандартних парафінових гістологічних блоків отримували на ротаційному мікромомі Shandon Finesse 325. Зразки забарвлювали за допомогою гематоксиліну та еозину. Імуногістохімічні реакції були проведені за стандартним протоколом з використанням моноклональних мишачих антитіл у рекомендованих виробником концентраціях.

Мікробіологічне дослідження мікрофлори здійснювали одноразово шляхом інтраопераційного забору матеріалу, який потім поміщали до транспортного середовища Amies, виробництва Jiangsu Suyun Medical Materials Co., Ltd – для виявлення бактеріальної та грибкової мікрофлори.

Для первинного накопичення мікроорганізмів використовували середовище Ендо, 5 % кров'яний агар, жовтково-сольовий агар, Bacteroides Bile Esculin Agar, Середовище Сабуро, Ceftrimide Agar Base, Селективне середовище для культивування мікоплазм та уреаплазм, поживне середовище «СВГ» та набір СВТ-50 (Рис. 4.1). Наступним етапом було отримання кількості мікробних клітин у змиві з 1 мл тампона в 1 мл середовища.

Ідентифікацію накопичених чистих культур бактеріальної етіології проводили за загальноприйнятими методиками: за морфологічними, тинкторіальними, культуральними, біохімічними та антигенними властивостями. Біохімічні властивості групи бактерій Enterobacteriaceae вивчали за допомогою ідентифікуючих тест-систем «Rapid 20 E» («Bio Merieux» (Франція), кокової флори – за допомогою «строкатих» рядів (середовища Хісса).

Макроскопічно СА не виділялися на тлі тканини ПЗ. Лише в деяких випадках було помітне візуальне випинання структур з просвіту простатичних залоз.

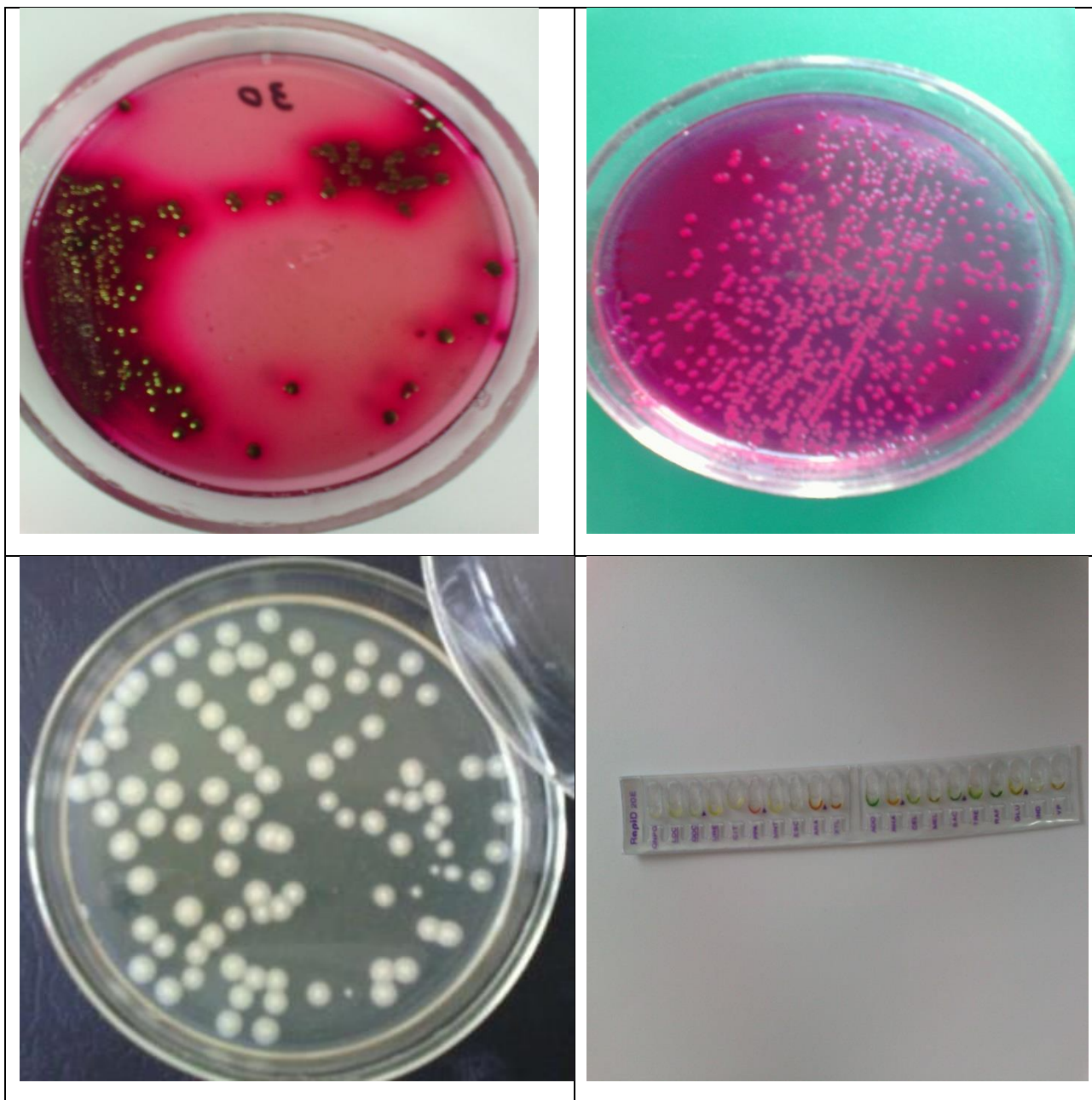


Рисунок 4.1 – Середовище ЕНДО з культурою *E. coli*. В. Середовище ЕНДО з культурою бактерій роду *Klebsiella*. С. Середовище ЕСА з культурою *Staphylococcus aureus*. D. Ідентифікуюча тест-система «Rapid 20 E».

Мікроскопічно під час забарвлення гематоксилін-еозином СА мали округлу форму, пошарову структуру, часто виявлялися декілька СА в просвіті однієї залози, подекуди на різних стадіях формування (Рис. 4.2).

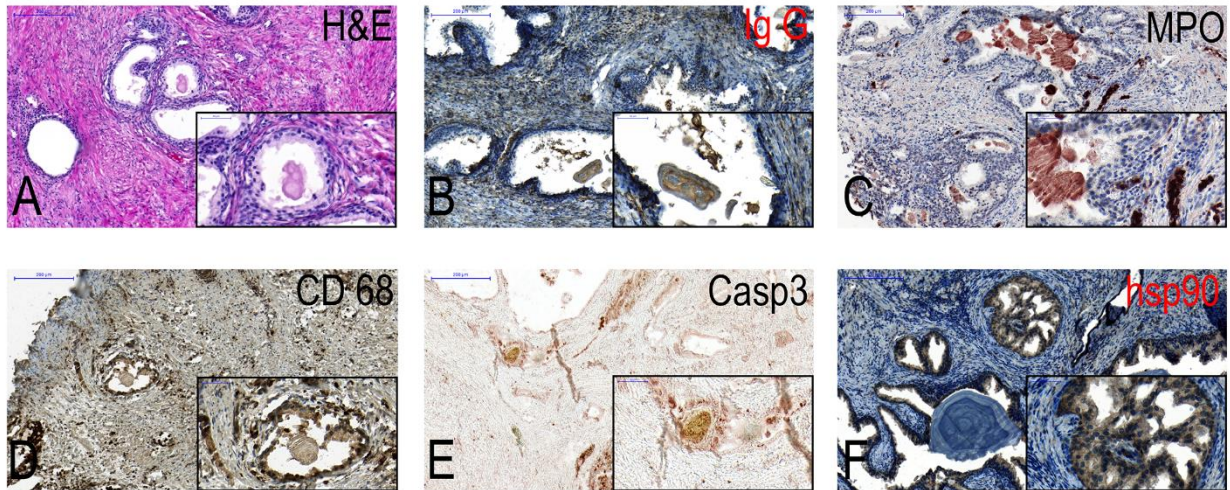


Рисунок 4.2 – Гістологічне та імуногістохімічне дослідження тканини передміхурової залози.

Серед досліджених зразків простати з ХБП *E.coli* визначалася у 63,6% випадків, *S.aureus* та *P.vulgaris* по 9,1% пацієнтів відповідно, *Klebsiella spp.* у 18,2% досліджуваних зразків. Хронічний бактеріальний простатит характеризувався значною змішаноклітинною запальною інфільтрацією навколо залоз та у стромі органу. Імуногістохімічно було виявлено значну експресію Hsp 90 у епітелії залоз простати. Реакція у стромі спостерігалася навкруги вогнищ запалення. Крохмальні тільця мали округлу форму та шарувату (lamellar) структуру, між шарами були виявлені депозити Hsp 90. У місцях прилягання крохмальних тілець до залозистого епітелію спостерігається гіперекспресія Hsp 90.

## 5. УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Злоякісні пухлини тіла матки є поширеною патологією серед жіночого населення України, як і у світі в цілому [1]. У Сумській області виявлено дещо вищі показники захворюваності на злоякісні пухлини взагалі, так і неоплазії тіла матки, що може бути пов'язано з територіальними та діагностичними особливостями у регіоні. Основний контингент хворих складають жінки постменопаузального віку, що пов'язано з впливом дисгормонемії на ініціювання та прогресування неоплазій [21]. Не зважаючи на сучасні діагностичні досягнення в онкологічній практиці, на доволі високому рівні залишається дорічна та загальна летальність від злоякісних пухлин матки у жінок, що майже вдвічі перевищує загальносвітові показники [3].

Як і у світі [2,22], найбільш поширеним гістологічним варіантом пухлини матки є ЕА зі значно меншою кількістю інших морфологічних варіантів (серозна, муциозна, світлоклітинна та інші карциноми). Нажаль, більшість з них (80%) має низькі ступені диференціювання (G2-3). При гістологічному дослідженні виявлено, що інтактна, гіперпластична та неопластична тканини мають різний ступінь васкуляризації, який представлений різним типом судин.

На підставі проведення імуногістохімічного дослідження з визначенням рецепторів до CD31 та подопланіну, виявлено варіабельну судинну щільність у різних типах тканин матки. Так, спостерігається посилення васкуляризації гіперпластичної тканини, у порівнянні з нормою, яка у більшості випадків представлена спіральними артеріями та тонкостінними венами. Серед них в обох типах тканин виявлено поодинокі лімфатичні судини (наявність експресії до подопланіну). Неопластична тканина характеризується значним зростанням кількості капілярів серед пухлинних клітин. Рівень ангиогенезу напряму залежить від ступеню

злякисності ЕА. При прогресуванні пухлини відбувається зростання і кількості лімфатичних судин, які представлені тонкостінними утвореннями з цитоплазматичною експресією рецепторів до подопланіну в ендотеліальних клітинах.

Аналізуючи вищезазначене, можна стверджувати, що у міру пухлинної трансформації та прогресування неоплазій відбувається посилення ангиогенезу тканини злякисної пухлини, яка представлена дрібними судинними утвореннями з постійною пролонгацією цього процесу. Без сумніву, це знаходить своє відображення на загальному перебігу захворювання, призводячи до виникнення лімфогенного та гематогенного метастазування пухлини, які є найбільш частою причиною летальності у жінок з ЕА [4]. Цей процес реалізується за рахунок бар'єрної нестабільності стінки новоутворених судин під впливом ангиогенних факторів росту, які секретуються неопластичними клітинами та пухлинним мікрооточенням [23]. З іншого боку, виявлене зростання мікрокапілярної щільності у міру прогресування неопластичного процесу може стати підґрунтям для включення васкулосупресорних препаратів (авастін та інші) у схеми протипухлинної терапії високоагресивних карцином ендометрію.

У численних наукових публікаціях, які присвячені питанню ПРМТ, описуються переважно поодинокі спостереження цього захворювання [24,25]. Новий погляд на МТ, як першоджерело ряду серозних неоплазій тазових органів відноситься до початку ХХІ століття, коли серед пацієнтів з *BRCA*-мутаціями, які зазнали профілактичної аднексектомії, була виявлені дисплазія та інтраепітеліальна карцинома не в яєчнику, а в фімбріальному відділі МТ [26]. Показники за системою TNM, а також «класичні» клініко-морфологічні параметри мають обмежене прогностичне значення при ПРМТ, у зв'язку з чим на сьогоднішній день актуальним є пошук нових прогностичних маркерів. Одним із таких індикаторів є VEGF, визначення якого може визначати прогноз та надати додаткову інформацію про

біологічну поведінку пухлини: швидкість її росту, здатність до інвазії і метастазування, стійкість до хіміопрепаратів [13-15].

У нашій роботі встановлено, що в більшості хворих (87,9%) була виявлена помірна або сильна цитоплазматична реакція в ендотеліальних клітинах та більше ніж у 70% пухлинних клітинах, розміщених дифузно в усіх полях зору. Таким чином, можна зауважити, що ангиогенез у тканині САкМТ проходить постійно і дуже інтенсивно, що зумовлює їх швидкий ріст та має несприятливе прогностичне значення.

Ангиогенний потенціал злоякісних пухлин МТ залежав від рівня диференціювання неоплазії ( $r=0,24$ ,  $p<0,05$ ) та клінічної стадії захворювання ( $r=0,21$ ,  $p<0,05$ ). Тобто, у процесі пухлинної прогресії та розповсюдженості неоплазії відбувається підвищення ступеня автономності пухлини та значно зростають показники процесів ангиогенезу в цих пухлинах. Взаємозв'язок між вираженою експресією VEGF та метастазуванням свідчить про те, що свідчить залежність розповсюдження ПРМТ від васкуляризації пухлинної тканини.

У цілому стероїд-негативні пухлини МТ характеризувалися більш високим вмістом VEGF. Враховуючи той факт, що висока експресія ER і PR у серозних пухлинах МТ корелює з високим ступенем диференціювання новоутворень та початковими клінічними стадіями захворювання, стає зрозумілим, що при зниженні диференціювання та розповсюдженні неопластичного процесу загальний контроль, в тому числі гормональний, над проліферуючим епітелієм слабшає чи зникає, одночасно супроводжуючись зростанням ендогенного впливу (синтез VEGF) над функціонуванням клітин. Установлено слабкий кореляційний зв'язок між експресією VEGF та p53 ( $r=0,25$ ,  $p<0,05$ ). Таким чином, можна припустити, що мутації p53 роблять пухлинні клітини нечутливими до сигналів, що блокують поділ та апоптоз клітин, але сприяють посиленню ангиогенезу, активуючи синтез VEGF. Статистично достовірного взаємозв'язку між експресією рецепторів VEGF та

наявністю рецепторів Ki-67 та bcl-2 у нашому дослідженні не виявлено ( $p > 0,05$ ).

Середній вік пацієнтів з РПЗ, які належали до експериментальної групи, складав на момент дослідження  $70,23 \pm 1,71$  років. В той же час для пацієнтів контрольної групи цей показник складав  $68,27 \pm 1,27$  років ( $p > 0,05$ ). Усі зразки РПЗ досліджуваних груп були представлені дрібноацинарною аденокарциномою.

Під час морфологічного дослідження тканини РПЗ експериментальної групи було виявлено структурну перебудову тканини передміхурової залози за рахунок кістозного розширення залоз, ретенції секрету, пов'язаного з наявністю інтралюмінальних включень амілоїдної та мінеральної природи. Також відзначалися ознаки хронічного запалення, механічного ушкодження епітеліальної складової залоз, наявність клітинного детриту у просвіті залоз, мікророзриви та деформація залоз. У оточуючій тканині спостерігалися розростання фіброзних волокон, поодинокі крововиливи та помірний набряк.

Неопластична тканина зразків контрольної групи характеризувалася відсутністю інтралюмінальних включень в залозах, що зумовлювало зменшення застійних явищ у залозах та протоках передміхурової залози, зниження травматизації залозистого епітелію. Зазначені зміни призводили до низької інтенсивності запальної реакції у тканині РПЗ цієї групи. [27].

Для помірнодиференційованих пухлин експериментальної групи була характерна більш чітка структура епітеліального компоненту з формуванням добре розпізнаваних залоз та псевдозалозистих структур, продукція та накопичення секрету, менша виразність вторинних змін пухлинної тканини.

Підгрупа ЕЗ була представлена зразками тканини РПЗ із спрощеною будовою неопластичної тканини, ракові клітини розташовувалися у вигляді неорганізованої маси, гнізд, ланцюгів, пластів та поодиноких клітин. Спрощення пухлинної тканини РПЗ проявлялося мономорфною будовою пухлинних клітин, значним зменшенням кількості залозистих структур,



наявністю вторинних змін у вигляді неркозів, вогнищ ослизнення та крововиливів.

Для зразків РПЗ підгрупи К2 була характерна диференційованість атипових залозистих структур, відсутність інтралюмінальних включень та вираженого застою секрету в залозисто-протоковій системі. Будова зразків РПЗ підгрупи К3 загалом відповідала морфологічній структурі підгрупи Е3 (окрім наявності інтралюмінальних включень та інтенсивності запальної інфільтрації).

Під час ІГХ дослідження (Рис. 5.1) впливу андрогенів на тканину РПЗ обох груп було виявлено високу її чутливість до досліджуваних гормонів у абсолютній більшості досліджуваних зразків (1 зразок з негативною реакцією у підгрупі Е3). Достовірної різниці між показниками експресії AR виявлено не було.

Раніше було вказано на залежність рівня експресії цих рецепторів та функціональної активності неопластичної тканини, зв'язок зі ступенем диференціювання [28]. Однак аналіз впливу ступеню диференціювання пухлини на рівень експресії AR у нашому дослідженні вказав на відсутність достовірної різниці показників.

Важливу роль у процесах апоптозу відіграє система білків p53 та Вах. p53-залежний апоптоз клітин відбувається опосередковано за рахунок активації білка Вах сімейства протеїнів Bcl-2 [29]. Достовірна різниця показників експресії p53 була виявлена лише між підгрупами Е2 та Е3 з вищою активністю в пухлинах з низьким рівнем диференціювання. Ці результати можуть свідчити про більшу залежність експресії p53 від ступеню диференціації пухлини, ніж від наявності інтралюмінальних включень.

Аналіз експресії проапоптотичного протеїну Вах продемонстрував достовірну різницю між показниками експериментальної та контрольної груп. Статистично значущої різниці у результатах ІГХ реакції між підгрупами Е2 та Е3, К2 та К3 виявлено не було. Це свідчить, що інтралюмінальні включення стимулюють утворення проапоптотичних

протеїнів та сприяють процесам апоптозу, в той же час як вплив ступеню диференціювання доведено не було.

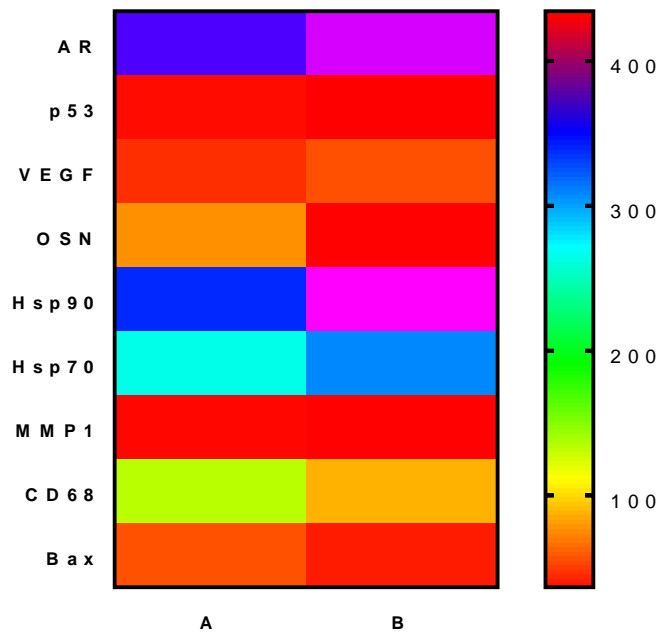


Рисунок 5.1 – Середні рівні експресії AR, p53, VEGF, OSN, Hsp90, Hsp70, MMP1, CD68 та Bax у тканині РПЗ експериментальної та контрольної груп.

Попередньо була доведена участь білків теплового шоку Hsp70 та Hsp90 у процесах пригнічення апоптозу шляхом блокування активності проапоптотичних білків (зокрема, каспаз) [30]. У нашому дослідженні було виявлено статистично-достовірну різницю між показниками експресії Hsp90 у експериментальній та контрольній групах. Присутність Hsp90 у структурі сопрога амуласеа може бути обумовлене його участю у процесах формування цих утворень. Впливу ступеня диференціювання на експресію Hsp90 не встановлено. У ході дослідження експресії Hsp70 не виявлено достовірної різниці між показниками експериментальної та контрольної групи, а також між підгрупами E2 та E3, K2 та K3. Це дозволяє припустити, що ні ступінь диференціювання РПЗ, ні наявність інтраюмінальних включень не впливають на експресію Hsp70.

Експресія MMP1 пов'язана з підвищенням інвазивного та метастатичного потенціалу пухлини, відноситься до прогностично-несприятливих маркерів [31]. Під час проведення ІГХ статистично значущої різниці між показниками експериментальної та контрольної групи виявлено не було. Однак спостерігається вплив ступеню диференціювання РПЗ на рівень експресії MMP1 як в експериментальній, так і в контрольній групах. Достовірно вищий рівень експресії MMP1 виявлений у підгрупах низькодиференційованих пухлин (Е3 та К3).

Багатьма авторами підвищена експресія VEGF пухлинною тканиною розглядається в якості прогностично-несприятливого фактора [32]. Отримані нами результати свідчать про достовірно вищу експресію VEGF у зразках РПЗ контрольної групи. Під час порівнянні підгруп (Рис. 5.2) помірно- та низькодиференційованих пухлин було виявлено переважання експресії у підгрупі К2. Це може свідчити про негативний вплив інтралюмінальних включень на процеси васкуляризації пухлинної тканини.

Для оцінки кількості клітин макрофагального ряду було застосовано ІГХ визначення експресії CD68. У ході дослідження було встановлено достовірно вищу кількість CD68-позитивних клітин у зразках тканини експериментальної групи. Відсутність різниці між показниками експресії CD68 у зразках РПЗ помірного та низького ступеня диференціювання у обох групах свідчить про відсутність впливу ступеню диференціювання на інфільтрацію пухлинної тканини клітинами макрофагального ряду. Присутність значної кількості клітин системи мононуклеарних фагоцитів свідчить про виразність явищ хронічного запалення за умов присутності інтралюмінальних включень.

OSN бере участь у процесах біомінералізації, ремоделювання екстрацелюлярного матриксу та може проявляти властивості інгібітора пухлинного росту, а також рівень його експресії залежить від ступеню диференціювання епітеліального та стромального компоненту різних типів пухлин [33]. Під час дослідження нами було виявлено достовірно вищий

рівень експресії цього гліпротеїну у зразках експериментальної групи. Це може бути обумовлено його участю у процесах утворення та росту простатолітів. Також відмічалася переважання експресії OSN у тканині помірнодиференційованих пухлин обох груп ( $p < 0,05$ ).

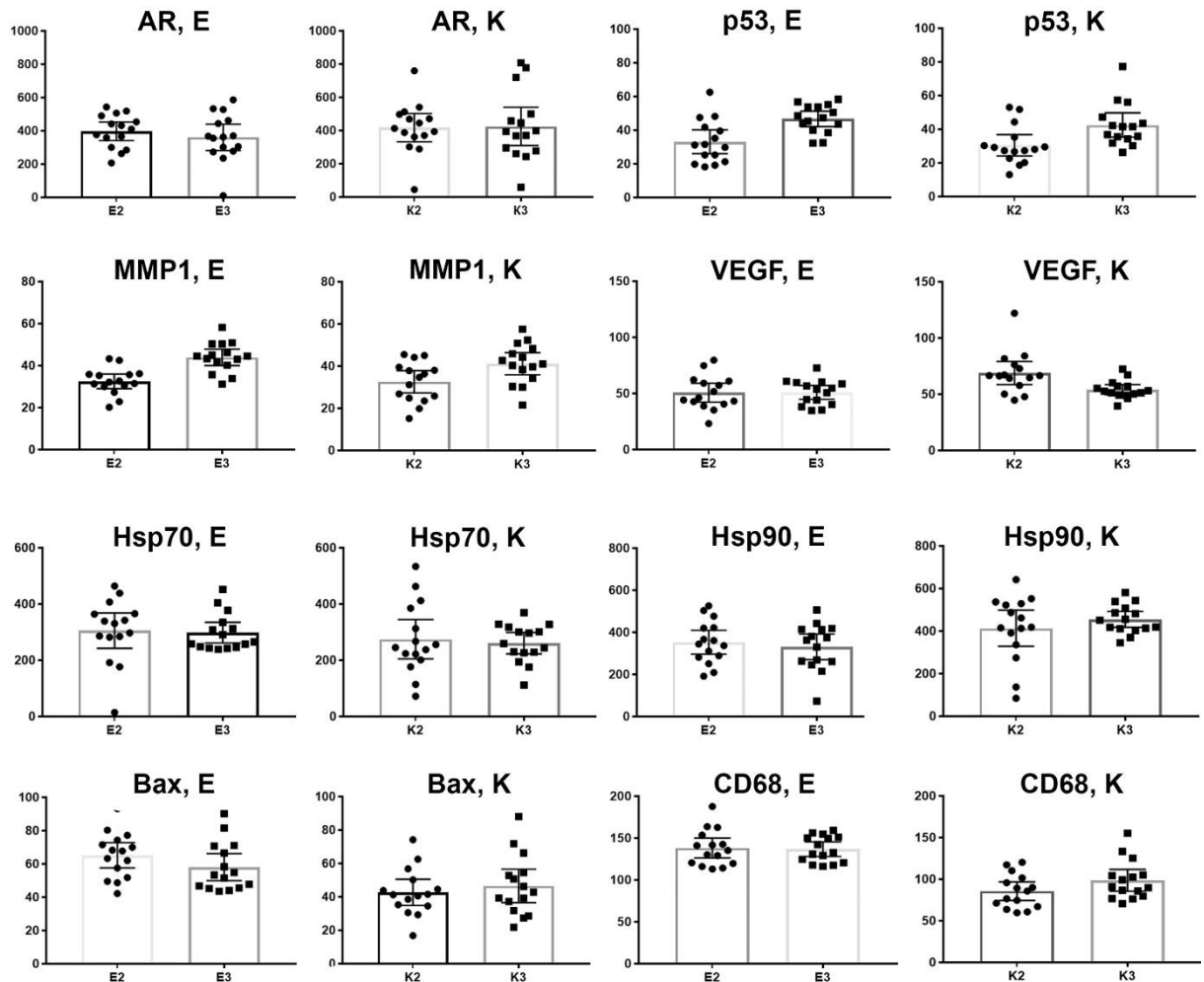


Рисунок 5.2 – Статистичне дослідження експресії AR, p53, MMP1, VEGF, Hsp70, Hsp90, Bax, CD68 та OSN у тканині РПЗ експериментальної та контрольної груп в залежності від ступеня диференціювання. Стовпчик вказує на середнє значення показника, бар – 95% інтервал достовірності.

## ВИСНОВКИ

1. За останні 7 років в Україні та Сумській області залишаються на високому рівні показники захворюваності, смертності, одно- та п'ятирічної летальності від злоякісних пухлин тіла матки з піком захворюваності у постменопаузальному періоді. Найбільш частим гістологічним її варіантом є ендометріодна аденокарцинома, яка у більшості маніфестує низько диференційованими гістологічними варіантами. При пухлинній трансформації у тканині ендометрію спостерігається посилення ангиогенезу зі зростанням мікроваскулярної щільності. Поряд з цим відбувається активація лімфангиогенезу. Щільність розташування кровоносних та лімфатичних судин напряму залежить від диференціювання пухлин, зростаючи при їх катаплазії.

2. Ангіогенний потенціал серозної аденокарциноми маткових труб корелює з рівнем дедиференціювання неоплазії, клінічною стадією захворювання, негативним гормональним та p53-позитивним статусом ( $p < 0,05$ ). Усі випадки метастазування у регіонарних лімфатичних вузлах супроводжувалися високою експресією рецепторів VEGF. Визначення експресії VEGF можна застосовувати з високим ступенем ймовірності як прогностичні маркери, що визначає швидкість росту новоутворення та ризик метастазування. Крім того, високий ангиогенний потенціал неоплазій актуалізує використання анти-VEGF-терапії, що підвищить ефективність лікування та покращить результати загальної та безрецидивної виживаності пацієнток.

3. Наявність інтралюмінальних включень у тканині РПЗ експериментальної групи сприяє ремоделюванню тканини з порушенням секреторного циклу залоз та дренажної функції що призводить до механічної травматизації, розвитку хронічного запалення, фіброзування. У зразках РПЗ виявлена висока експресія AR, котра не залежала від ступеню диференціювання та присутності інтралюмінальних включень. Рівень

експресії VEGF вищий у більш диференційованих пухлинах контрольної групи, що може свідчити про пригнічуючий вплив інтралюмінальних включень на процеси васкуляризації пухлинної тканини. Значення цього явища неясне та потребує подальших досліджень. Зі зниженням ступеню диференціації РПЗ підвищується рівень експресії прогностично-несприятливих маркерів p53 (за присутності інтралюмінальних включень) та MMP1. Рівень експресії OSN вищий у тканині РПЗ з інтралюмінальними включеннями, що обумовлене його участю у процесах біомінералізації. Одночасно експресія цього глікопротеїну знижується зі ступенем диференціювання пухлини. Рівень експресії маркера клітин макрофагального ряду CD68 та проапоптотичного протеїну Вах достовірно вищий у групі РПЗ з інтралюмінальними включеннями. Це може бути обумовлено фізичною травматизацією епітелію та навколшиніх тканин, розвитком хронічного запалення. Білок теплового шоку Hsp90 має достовірно нижчий рівень експресії у тканині РПЗ з інтралюмінальними включеннями, що може бути обумовлене його депонуванням у структурі corpora amylacea. Експресія білка теплового шоку Hsp70 не залежала від присутності інтралюмінальних включень та ступеню диференціювання РПЗ.

4. Гіперекспресія Hsp 90 у тканині ХБП з крохмальними тільцями вказує на участь цих білків теплового шоку у розвитку і формуванні corpora amylacea. Hsp 90 overexpression may be regarded as a prospective (potential) role to the development of corpora amylacea.

**ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ**

1. Siegel R. Cancer statistics, 2015. / R. Siegel, K. Miller, A. Jemal // *CA Cancer J Clin.* – 2015. – P. 65:5-29.
2. Brain metastases from endometrial carcinoma: A retrospective study. / L. T. Gien, J. S. Kwon, D. P. D'Souza, et al. // *Gynecol Oncol.* – 2004. – Vol.93. – P. 524–8.
3. Winter W. E. Uterine Cancer. / W. E. Winter, J. A. Gosewehr // *E Medicine.* – 2006.
4. Srikantia N. Endometrioid endometrial adenocarcinoma in a premenopausal woman with multiple organ metastases. / N. Srikantia, S.N. Kalyan // *Indian J Med Paediatr Oncol.* – 2009. – Vol.30,№2. – P. 80-3.
5. Сумцов Г. А. Первичный рак маточных труб: / Г. А. Сумцов, Д. Г. Сумцов. – Сумы, 2015. – (Сумский государственный университет).
6. Kessler M. The molecular fingerprint of high grade serous ovarian cancer reflects its fallopian tube origin. / M. Kessler, C. Fotopoulou, T. Meyer. // *Int J Mol Sci.* – 2013 Mar 25. – Vol. 14,№2. – P. 6571–96.
7. The fallopian tube as the origin of high grade serous ovarian cancer: review of a paradigm shift / [C. J. 3. Reade, R. M. McVey, A. A. Tone et al.]. // *J Obstet Gynaecol Can.* – 2014 Feb. – Vol. 36,№2. – P. 133–40.
8. Karst A. M. Modeling high-grade serous ovarian carcinogenesis from the fallopian tube / A. M. Karst, K. Levanon, R. Drapkin. // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2011 May 3. – Vol.108,№18. – P. 7547–52.
9. Carcinoma of the fallopian tube. FIGO 26th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer / [A. P. Heintz, F. Odicino, P. Maisonneuve et al.]. // 2006. – №95 Suppl 1. – P. 145–60.
10. Tumor progression, histologic grading and DNA-ploidy as predictive factors of lymphogenous metastasis in primary carcinoma of the Fallopian tube. /

[M. Klein, A. H. Graf, A. Rosen et al.]. // *Cancer Lett.* – 2002 Mar 28. Vol.177, № 2. – P. 209–14.

11. Vascular endothelial growth factor 189 mRNA isoform expression specifically correlates with tumor angiogenesis, patient survival, and postoperative relapse in non-small-cell lung cancer / [A. Yuan, C. J. Yu, W. J. Chen et al.]. // *J Clin Oncol.* – 2001 Jan 15. – Vol.19. – P. 432–41.

12. VEGF-B: a survival, or an angiogenic factor? / [X. Li, C. Lee, Z. Tang et al.]. // *Cell Adh Migr.* – 2009 Oct-Dec. – Vol.3, №4. – P. 322–7.

13. Wang K. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in patients with prostate cancer: a systematic review with meta-analysis / K. Wang, H. L. Peng, L. K. Li. // *Asian Pac J Cancer Prev.* – 2012. – Vol.13, №11 – P. 5665–9.

14. Can vascular endothelial growth factor and microvessel density be used as prognostic biomarkers for colorectal cancer? A systematic review and meta-analysis. [Электронный ресурс] / [Y. Wang, X. Yao, J. Ge et al.] // *Scientific World Journal.* – 2014. – Режим доступа до ресурсу: doi: 10.1155/2014/102736.

15. Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene in epithelial ovarian cancer: an approach to anti-VEGF therapy / [K. Hata, Y. Watanabe, H. Nakai et al.]. // *Anticancer Res.* – 2011. – Vol.31, №2. – P. 31–7.

16. What is the benefit of bevacizumab combined with chemotherapy in patients with recurrent ovarian, fallopian tube or primary peritoneal malignancies? / [X. Cheng, J. W. Moroney, C. F. Levenback та ін.]. // *J Chemother.* – 2009 Nov. – Vol.21, №5. – P. 566–72.

17. American Cancer Society. Cancer Facts and Figures 2016. Available online: <http://www.cancer.org/Cancer/ProstateCancer/index> (accessed on 15 December 2016)

18. Sfanos, K.S.; de Marzo, A.M. Prostate cancer and inflammation the evidence. *Histopathology* 2012, 60, 199–215

19. Jonathan I. Epstein, Michael J. Zelefsky, Daniel D. Sjoberg, Joel B. Nelson, Lars Egevad, Cristina Magi-Galluzzi, Andrew J. Vickers, Anil V. Parwani,



Victor E. Reuter, Samson W. Fine, James A. Eastham, Peter Wiklund, Misop Han, Chandana A. Reddy, Jay P. Ciezki, Tommy Nyberg, Eric A. Klein. A Contemporary Prostate Cancer Grading System: A Validated Alternative to the Gleason Score. *Eur Urol.* 2016 Mar;69(3):428-35.

20. The homogeneous and heterogeneous risk factors for the morbidity and prognosis of bone metastasis in patients with prostate cancer. Xu Guo, Chao Zhang,\* Qi Guo, Yao Xu, Guowei Feng, Lili Li, Xiuxin Han, Feng Lu, Yulin Ma, Xin Wang,<sup>5</sup> and Guowen Wang<sup>1</sup> *Cancer Manag Res.* 2018; 10: 1639–1646.

21. Long-term use of postmenopausal estrogen and progestin hormone therapies and the risk of endometrial cancer. / J. A. Doherty, K. L. Cushing-Haugen, B. S. Saltzman, et al. // *Am J Obstet Gynecol.* – 2007. – Vol.197,№2. – P. 139.e1-7.

22. Carmen M. G. Uterine papillary serous cancer: a review of the literature. / M. G. Carmen, M. Birrer, J.O. // *Schorge Gynecol Oncol.* – 2012. – T.127,№3. – C. 651-61.

23. Molecular mechanisms of tumor vascularization. / P. Auguste, S. Lemiére, F. Larriéu-Lahargue, A. Bikfalvi // *Crit Rev Oncol Hematol.* – 2005. – Vol.54,№1. – P. 53-61.

24. Improved survival for fallopian tube cancer: a comparison of clinical characteristics and outcome for primary fallopian tube and ovarian cancer [Электронный ресурс] / [S. L. Wethington, T. J. Herzog, V. E. Seshan et al.] // *Cancer* Dec 15. – 2008. – Режим доступа до ресурсу: doi: 10.1002/cncr.23957.

25. Small fallopian tube carcinoma with extensive upper abdominal dissemination: a case report / C.Oliveira, H. Duarte, C. Bartosch, D. Fernandes. // *J Med Case Rep.* – 2013. – Vol.7. – P. 252.

26. Molecular evidence linking primary cancer of the fallopian tube to BRCA1 germline mutations / [R. P. Zweemer, P. J. vanDiest, R. H. Verheijen et al.]. // *Gynecol Oncol.* – 2000. – Vol.76,№1. – P. 45–50.

27. Acute inflammatory proteins constitute the organic matrix of prostatic corpora amylacea and calculi in men with prostate cancer. Karen S. Sfanos, Brice A. Wilson, Angelo M. De Marzo, and William B. Isaacs . PNAS March 3, 2009. 106 (9) 3443-3448;

28. Am J Clin Exp Urol. 2018 Apr 1;6(2):62-77. eCollection 2018. Androgen action in prostate function and disease. Banerjee PP1, Banerjee S2, Brown TR3, Zirkin BR3.

29. Levesque AA1, Eastman A. p53-based cancer therapies: Is defective p53 the Achilles heel of the tumor? Carcinogenesis. 2007 Jan;28(1):13-20. Epub 2006 Nov 4

30. Heat shock proteins in pathology: A review. Deepti Garg Jindala, Varun Jindalb, Sonia Joshia, Ishita Bhojiac, Arjun Chawdhryc. Journal of Pierre Fauchard Academy (India Section). Volume 30, Issues 3–4, September–December 2016, Pages 84-87

31. Association between MMP1-1607 1G>2G Polymorphism and Head and Neck Cancer Risk: A Meta-Analysis / C. Zhang, X. Song, M. Zhu [et al.] // PloS One. – 2013. – №8(2). – P. 285–293

32. Predictive values of vascular endothelial growth factor and microvessel-density levels in initial biopsy for prostate cancer. Kervancioglu E1, Kosan M2, Erinanc H3, Gonulalan U4, Oguzulgen AI2, Coskun EZ3, Ozkardes H2. Kaohsiung J Med Sci. 2016 Feb;32(2):74-9. doi: 10.1016/j.kjms.2015.12.001. Epub 2016 Jan 16.

33. David K.Chang, Nigel B. Jamiesonaf, Sean M. Grimmondag, Andrew V. Biankinabcde for the Australian Pancreatic Cancer Genome Initiative. Handbook of Pharmacogenomics and Stratified Medicine. Chapter 34 - Stratified Medicine for Pancreatic Cancer. 2014, Pages 807-814.