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

ВИЗНАЧЕННЯ РІВНЯ CEACAM У БІОЛОГІЧНИХ РІДИНАХ, ІМУНОГІСТОХІМІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ТКАНИН

(проміжний)

Науковий керівник
канд.мед наук, доцент Р.А. Москаленко

2019

Рукопис закінчено 24 грудня 2019 р.
Результати роботи розглянуто науковою радою СумДУ, протокол №4 від 26 листопада 2019 р.

СПИСОК АВТОРІВ

Керівник НДР, гол.наук. співроб., канд.мед. наук	_____ (24.12.2019)	Москаленко Роман Андрійович (розділи 1,2,3)
Ст.наук. співроб., канд. мед. н	_____ (24.12.2019)	Линдін Микола Сергійович (розділ 2,3)
Молодший наук. співроб.	_____ (24.12.2019)	Піддубний Артем Михайлович (розділ 2)
Молодший наук. співроб.	_____ (24.12.2019)	Линдіна Юлія Миколаївна (розділ 2)
Молодший наук. співроб.	_____ (24.12.2019)	Сікора Катерина Олексіївна (розділ 2)
Молодший наук. співроб.	_____ (24.12.2019)	Гудименко Олена Олександрівна (розділ 2)
Молодший наук. співроб.	_____ (24.12.2019)	Коломієць Олена Олегівна (розділ 2)
Лаборант	_____ (24.12.2019)	Палій Тарас Володимирович (розділ 2)
Лаборант	_____ (24.12.2019)	Ворожко Ольга Анатоліївна (розділ 1)
Лаборант	_____ (24.12.2019)	Кругляк Галина Миколаївна (розділ 1)

РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 48 с., 20 рис., 50 джерел.

ІМУНОГІСТОХІМІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ, МАТКА, ПРОСТАТА, МОЛОЧНА ЗАЛОЗА, CEACAM1.

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:

- Визначити рівні CEACAM у біологічних рідинах за допомогою імуноферментного аналізу (ELISA) та вестернблотингу
- Провести імуногістохімічне дослідження тканин з використанням антитіл до вірогідних онкомаркерів CEACAM та інших прогностичних маркерів
- Виконати статистичний аналіз результатів імуногістохімічного та імуноферментного дослідження.

Методи дослідження – гістологічне, імуногістохімічне (імуноферментне та імунофлюоресцентне) дослідження інтактної та пухлинної тканини матки, молочної залози та простати, математичні методи. Дослідження спрямовані на встановлення імунофенотипу нормальної та пухлинної тканини, взаємозв’язку між його прогностичними параметрами.

ЗМІСТ

Вступ---------- 5

1 Дослідження морфологічних та імуногістохімічних особливостей молочної залози ----------10

2 Встановлення прогностичного значення експресії CEACAM1, CEACAM5 та CEACAM6 у тканині ендометрію----------21

3 Порівняльний аналіз впливу простатолітів та corpora amylacea на імунофенотип раку передміхурової залози---------- 30

4 Узагальнення отриманих результатів---------- 37

5 Висновки---------- 42

Перелік джерел посилання----------43

ВСТУП

Функціонуючий ендометрій циклічно змінюється під впливом естрогену та прогестерону протягом менструального циклу. Ці стероїдні гормони викликають структурні та функціональні перебудови у матці, взаємодіючи з рецепторами до естрогену (ER) та прогестерону (ER). Вони експресуються як залозистим епітелієм та стромальними клітинами ендометрію, так і клітинами міометрію. Кількість рецептор-позитивних клітин та інтенсивність експресії ER та PR постійно змінюється протягом менструального циклу [1].

Дисбаланс у концентрації естрогену та прогестерону у крові викликає порушення структурно-функціональних перебудов ендометрію та може бути передумовою розвитку пухлин у матці [2]. Ендометріальні карциноми є найбільш частими злоякісними пухлинами серед них, посідаючи перше місце серед карцином жіночої статевої системи [3]. Залежно від впливу стероїдних гормонів на виникнення та прогресування пухлин, а також їх чутливості до гормональної терапії ендометріальні карциноми традиційно поділяють на Type I та Type II [4]. До гормонально-чутливих пухлин (Type I) відносять ендометріоїдні ендометріальні карциноми, до Type II пухлин (гормонально-нечутливих) – серозні та світлоклітинні ендометріальні карциноми [2,4,5]. Вони значно відрізняються не тільки чутливістю на гормональні стимули, але і кількістю рецептор-позитивних клітин до них [6,7].

Незважаючи на значні досягнення у виявленні та лікуванні ендометріальних карцином, і досі залишається високим рівень летальності від цієї патології [3]. Це спонукає до пошуку нових діагностично-прогностичних маркерів. Одними з таких індикаторів пухлинної прогресії можуть бути молекули клітинної адгезії раково-ембріонального антигену (carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules – CEACAMs), які знайдено у переважній більшості епітеліальних клітин, ендотелії судин та лейкоцитах [8]. Це високо глікозильовані глікопротеїни суперсімейства

імуноглобулінів, які існують у розчинній та фіксованій у [9]. Серед них найбільш вивченими представниками є CEACAM1, CEACAM5 та CEACAM6. З однієї сторони вони приймають участь у функціонуванні організму, впливаючи на процеси ангіогенезу, обмін речовин, імунну відповідь, та інші. З іншої сторони, коливання їх у неопластичній тканині відображається на перебігу пухлинного процесу [8-12].

Нормальний ендометрій незалежно від фази менструального циклу має CEACAM1 експресію на апікальній поверхні люмінального та залозистого епітелію [13-16]. Натомість CEACAM5 та CEACAM6 зазвичай не експресуються клітинами матки – лише в одному випадку виявлено низький рівень CEACAM5 в залозистих ендометріальних клітинах [15]. Виникнення та прогресування ендометріальних карцином супроводжуються значними якісними та кількісними коливаннями CEACAM1 експресії у неопластичній тканині [13-14]. Зі зростанням злоякісності відбувається поступове зникнення CEACAM1 з поверхні пухлинних клітин, у окремих випадках спостерігається зміна його апікальної експресії на експресію по всій мембрані [13]. На сьогодні не існує спільної думки про їх участь у карциногенезі. З однієї, сторони їх дисрегуляція при прогресуванні ендометріальних пухлин є індикатором їхнього супресивного впливу [13]. З іншої сторони, дані про ко-експресію CEACAM1 та остеопонтіну у різних ендометріоїдних, серозних та світлоклітинних карциномах вказують на їх модулюючий ефект на інвазивність неопластичних клітин [14].

Відомості щодо впливу CEACAMs на функціонування ER та PR у матці нажаль відсутні. Але неодноразово повідомлялося про їх взаємодію у пухлинах молочної залози [17-20]. У більшості випадків стан ER та PR тканини раку молочної залози не залежав від CEACAM1 [17,20], хоча є повідомлення про спільну експресію між цими рецепторами [19]. Більше того, майже протилежні результати були отримані при аналізі концентрації CEACAM1 у сироватці крові та експресії ER в тканинах раку молочної

залози. Підвищення рівня CEACAM1 у сироватці крові супроводжувалося негативним статусом пухлинних тканин до ER [18].

На сьогодні висловлюються суперечливі припущення щодо впливу CEACAM1 на проліферативну активність пухлинних клітин [17,18,20-26]. З однієї сторони, показано їх модулюючий вплив на інтенсивність поділу клітин [22]. З іншої сторони, будучи субстратом для інсуліну та рецепторів епідермального фактору росту, вони пригнічують проліферативну активність клітин [24-25]. Більш того, значна кількість проведених досліджень взагалі не виявили будь-якого зв'язку між експресією CEACAM1 та Кі-67 (маркер проліферації клітин) [17,18,20]. Досліджуючи тканину раку молочної залози, ми виявили чіткий взаємозв'язок між ступенем експресії CEACAM1 та рівнем проліферативної активності пухлинних клітин – наявність CEACAM1 у неопластичних клітинах мала інгібуючий ефект на їх поділ.

Крім того, попередні дослідження демонструють зв'язок між експресією CEACAM1 та іншими білками, а також поведінкою пухлинних клітин. Їх гомофільні та гетерофільні взаємозв'язки призводять до прояву їх адгезивних властивостей [26,27]. Змінюючи активність E-/N-кадгерину та MMP2/TIMP2, CEACAM1-4S викликає пригнічення клітинної інвазії та міграції [28]. Незважаючи на наявність позитивної експресії на апікальній частині клітин молочної залози, не було виключено їх участі у адгезії клітин-клітин та клітин-ECM [29]. Сприяючи апоптозу, вони призводять до утворення просвіту молочної залози [27]. Незважаючи на це, експресія CEACAM1 була різко знижена в клітинах, що експресують мутантний p53 [30]. Leung та ін. продемонстрували зменшення апоптозу в ворсинах товстої кишки Ceacam1$^{-/-}$ мишах [31]. Крім того, ці дані були підтверджені CEACAM1-посередництвом апоптозу для клітин карциноми молочної залози [32] та регульованою індукцією ATM/p-53 індукції клітинного старіння шляхом пошкодження ДНК [33]. Затримка спонтанного та індукованого лігандом апоптозу збільшує виживання гранулоцитів, моноцитів та Т-

лімфоцитів [34-36]. Навпаки, перенапруження CEACAM1 призвело до загибелі В-лімфоцитів [37].

Експресія фактора росту судинного ендотелію (VEGF) є одним з найнадійніших прогнозних показників васкулогенезу пухлини та його розповсюдження. CEACAM1 бере участь у активації VEGF, індукуючи утворення мікросудин [38,39]. У цих та інших дослідженнях [40,41] мікросудинна щільність та ступінь неоваскуляризації тканин залежали від експресії CEACAM1 нормальними та злоякісними епітеліальними клітинами, а також від їх спільної експресії з VEGF [42]. Крім того, присутність CEACAM1 на ендотеліальних клітинах призводить до їх участі у функціонуванні стінок судин [43]. У тканинах молочної залози, незважаючи на посилення ангіогенезу та васкуляризацію пухлини, лише перитуморальні судини виражають CEACAM1 [44]. Всупереч цьому, Riethdorf та ін. в нормальних та неопластичних тканинах молочної залози не виявили жодної CEACAM1-позитивного судини.

Наявність всіх вищезазначених суперечливих даних про вплив CEACAMs на гормональний та проліферативний фенотип пухлин спонукає до більш детального дослідження нормального ендометрію та різних ендометріальних карцином на предмет участі CEACAMs у варіабельності експресії рецепторів до стероїдних гормонів та проліферативну активність клітин. Саме це і стало метою цього нашого дослідження.

Іншою важливою проблемою є вплив якісного складу пухлинного мікрооточення на фенотип онкологічного процесу. Саме для засування участі патологічної біомінералізації тканини раку передміхурової залози приділялася нами значна кількість уваги. Рак передміхурової залози (РПЗ) є провідною причиною смертності чоловічого населення по всьому світу. Щорічно у світі діагностується понад 1,6 мільйонів нових випадків РПЗ [45]. Хоча 5-річна відносна виживаність пацієнтів з РПЗ має тенденцію до зростання, однак РПЗ займає друге місце у структурі смертності чоловіків від

неоплазій [46]. Для України є характерною тенденція до росту показників захворюваності на РПЗ [47].

Серед причин, що обумовлюють зростання захворюваності на РПЗ належать впровадження новітніх серологічних та інструментальних методів діагностики (визначення рівня простат-специфічного антигену, мультифокальна біопсія передміхурової залози), а також значне поширення запальних процесів, зокрема хронічного простатиту [48]. Хронічне запалення у передміхуровій залозі не лише створює умови для розвитку неоплазії, а й має стимулюючий ефект на ракові клітини. Це призводить до ракової прогресії та розвитку метастатичного поширення пухлини [49]. Встановлено, що наявність вогнищ хронічного запалення у передміхуровій залозі пов’язане з присутністю інтралюмінальний включень [50]. Ці утворення виявляються у вигляді простатолітів чи corpora amylacea (CA). Однак їх клінічне значення, механізми формування та вплив на тканину передміхурової залози є невисвітленим. Враховуючи це, ми приділили значну увагу дослідженню впливу протатолітів та corpora amylacea на імунофенотип раку передміхурової залози.

1 ДОСЛІДЖЕННЯ МОРФОЛОГІЧНИХ ТА ІМУНОГІСТОХІМІЧНИХ ОСОБЛИВОСТЕЙ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

Гістологічне дослідження нормальних тканин молочної залози, забарвлених гематоксиліном-еозином, дозволило виявити їх типову залозисто-протокову структуру. Епітеліальний компонент представлений внутрішнім люмінальним епітелієм, оточеним шаром базальних клітин. Стромальна частина молочної залози складається з волокнисто-жирової тканини з одиничними лейкоцитами та змінною васкуляризацією. У пухлинних тканинах були виявлені ділянки з різним ступенем їх злоякісності, а також нормальні вогнища молочної залози. Необхідно згадати, що тканини з лише одним морфологічним типом злоякісності були дуже рідкісними.

Імуногістохімічно було встановлено, що всі випадки та частини тканини РМЗ були позитивними до 6G5j. Отже, вони були використані для дослідження експресії CEACAM1. Молочна залоза характеризувалася наявністю рецептор-позитивних клітин у всіх частинах її залозисто-протокової структури. Вони розташовуються на апікальній поверхні люмінальних клітин (рис. 1.1). Слід зазначити, що інтенсивність фарбування була різноманітною, хоча вона мала безперебійний характер розподілу. Крім епітелію, деякі внутрішньо- та позасудинні лейкоцити, міоепітеліоцити та поодинокі судини були також позитивними до CEACAM1 (позитивний внутрішній контроль). Апокринний епітелій не мав жодної клітини з CEACAM1.

Пухлинна тканина характеризувалася різними закономірностями експресії CEACAM1 (рис. 1.2). У добре диференційованих пухлинах (областях) вони були виявлені на апікальній поверхні пухлинних клітин, які утворювали трубчасті структури. Після зникнення просвіту у трабекулярно-солідних утвореннях супроводжувалося їх зменшення та зникнення. З іншого боку, зростання клітинної атипії, що супроводжувало дедиференціацію пухлини, брало участь у дислокації CEACAM1 від верхівкової поверхні

клітин до всієї мембрани та їх цитоплазму. Пухлини зазвичай містили ділянки з різними малюнками експресії CEACAM1 (як CEACAM1 позитивні, так і негативні, або з різними моделями експресії у позитивних випадках CEACAM1), що демонструють фенотипічну гетерогенність як у кожному окремому випадку, так і в кожній окремій області того ж випадку (рис. 1.3). Це унеможливило прийняття рішення про CEACAM1-позитивний або CEACAM1-негативний статус пухлини. Крім цього, нормальна внутрішньо- та перитоморальна тканина молочної залози та інші види їх проліферативних порушень (включаючи осередки раку in situ) були присутніми між злоякісними тканинами. Інтраваскулярні та інтерстиціальні CEACAM1-позитивні лейкоцити з поодинокими судинами також були виявлені в пухлинних тканинах.

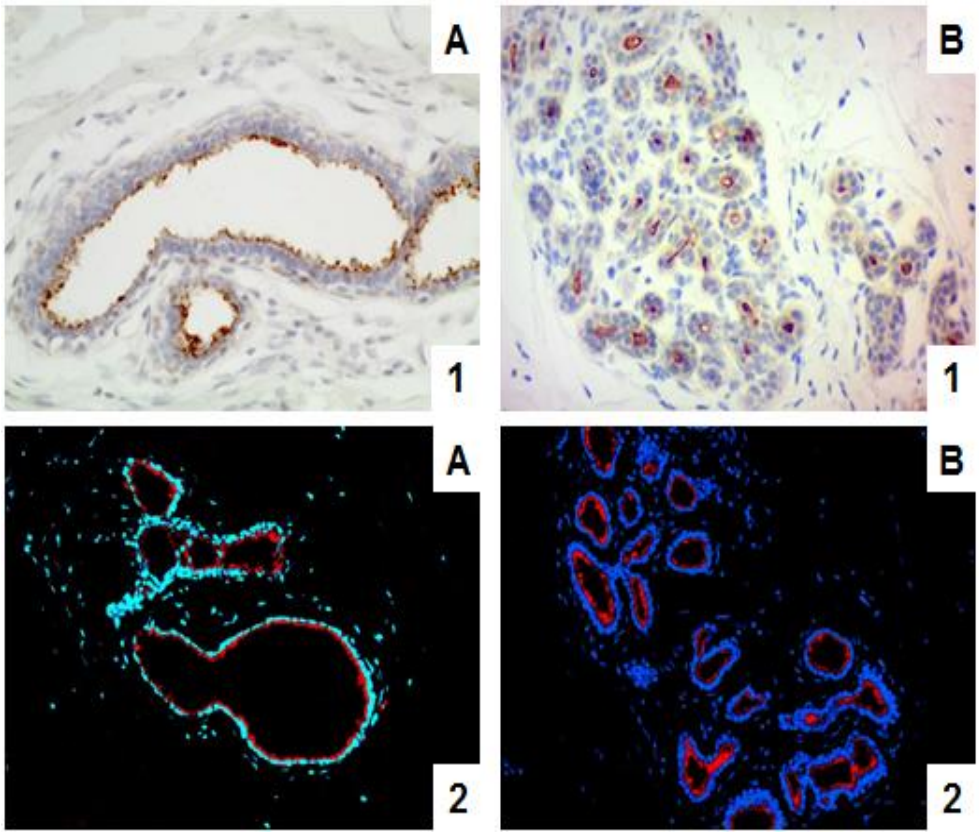


Рисунок 1.1 – Нормальна тканина молочної залози. А – протоки молочної залози, В – дольки молочної залози. Імуноферментне (1) та імунофлуоресцентне (2) дослідження CEACAM1 (CEACAM1 - червоний, DAPI - синій). Збільшення 1 - х400, 2 - х200.

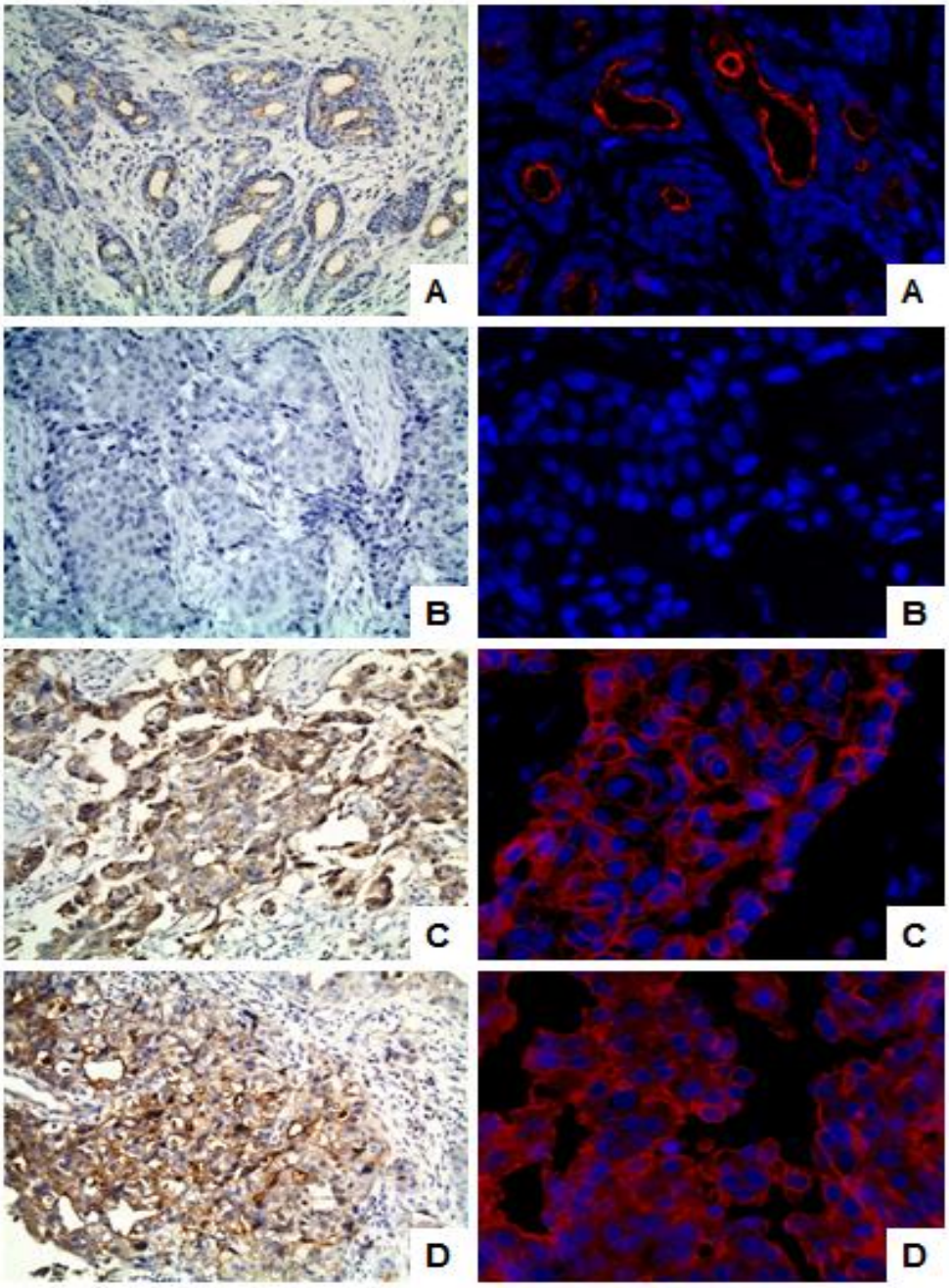


Рисунок 1.2 – Рак молочної залози. А - апікальна експресія CEACAM1, В – відсутність експресії CEACAM1, мембранна (С) та цитоплазматична (D) експресії CEACAM1. Імуноферментне (лівий стовпчик, х200) та імунофлуоресцентне (права колонка, х400) дослідження CEACAM1 (CEACAM1 - червоний, DAPI - синій).

Усі нормальні та злоякісні епітеліальні клітини експресують Е-кадгеринові рецептори (рис. 1.4). Їх існування на поверхні пухлинних клітин довело дуктальне походження злоякісного процесу у карциномах високого

ступеня. Вони були присутні на базолатеральній поверхні між нормальними епітеліальними клітинами та у контактах клітин-ECM.

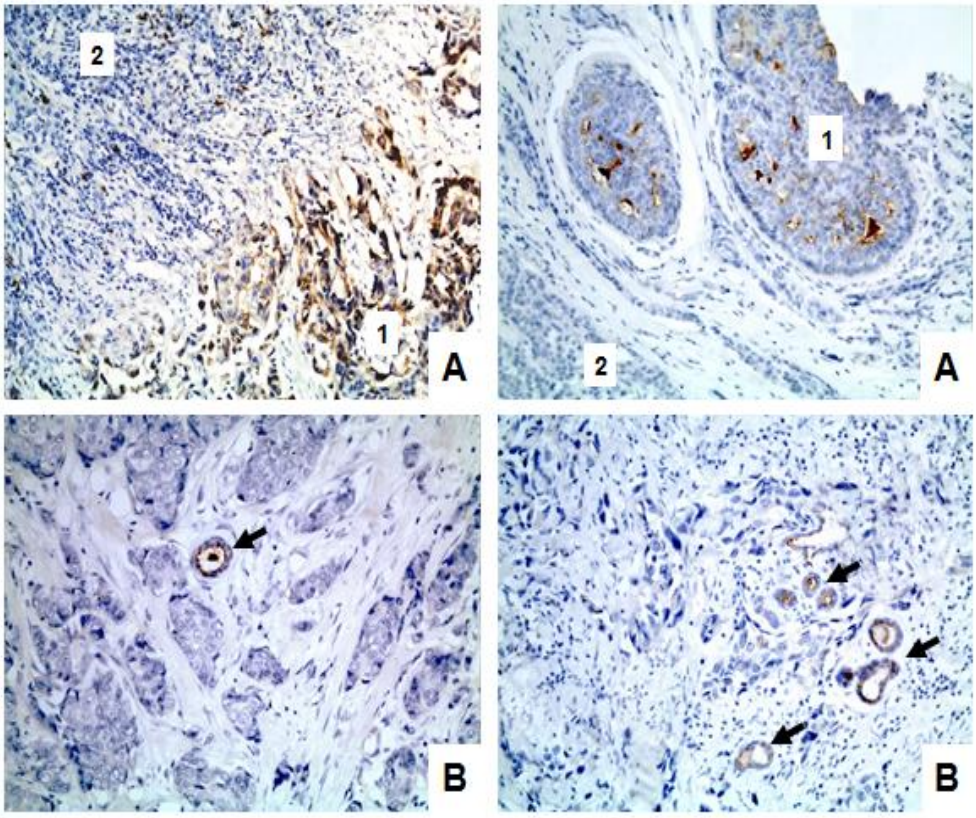


Рисунок 1.3 – Рак молочної залози. А - гетерогенні пухлині, які включають ділянки з позитивними пухлинами клітинами CEACAM1 (1) та негативними CEACAM1 (2), В - негативні пухлинні тканини CEACAM1 з ділянками нормальної тканини молочної залози (позначені стрілкою) з експресією CEACAM1 у клітинах просвіту. Імуногістохімічне дослідження CEACAM1. Збільшення х200.

Е-кадгеринові рецептори були виявлені між неопластичними клітинами та контактами клітин-ECM, за винятком тих частин їх мембрани, які обмежували просвіти пухлинних структур. Інтенсивність експресії Е-кадгерину зменшувалася одночасно зі зростанням злоякісності пухлини. Подвійне імунофлюоресцентне забарвлення та імуногістохімічні дослідження серійних зрізів дозволили виявити зовсім різні експресовані схеми Е-кадгерину та CEACAM1 у нормальних та злоякісних клітинах.

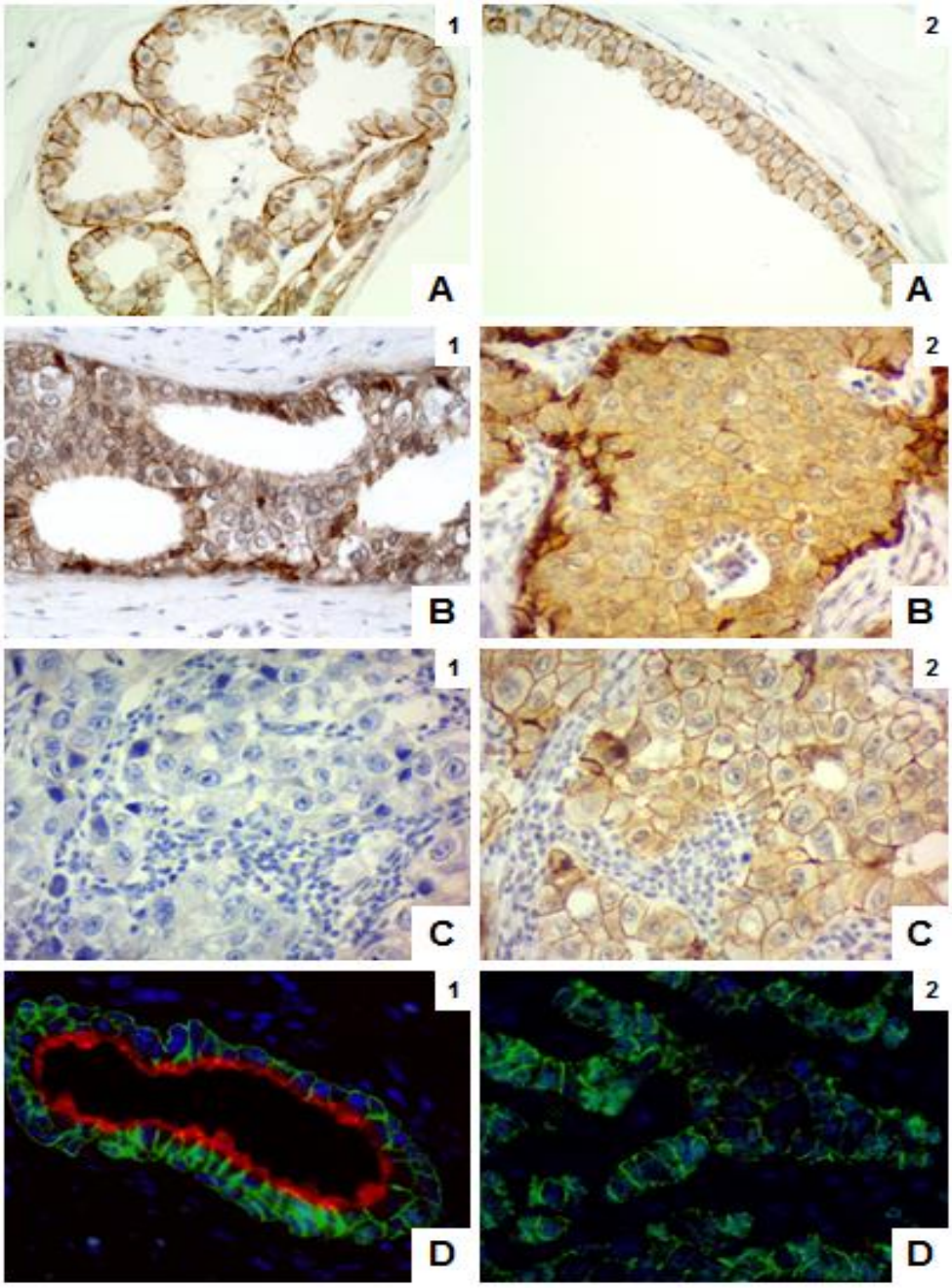


Рисунок 1.4 – Експресія Е-кадхерину в різних типах тканин молочної залози. А – базолатеральна експресія Е-кадгерину між нормальними епітеліальними клітинами в лобулярному (1) та протоковому (2) епітелії, В - експресія Е-кадгерину в тканині раку молочної залози. Відсутність цих білків у тих частинах мембрани (1), які обмежують просвіти пухлинних структур. С - серійні секції з дослідженням CEACAM1 (1) та Е-кадгерином (2). А, В, С - імуноферментне дослідження Е-кадгерину та CEACAM1 (С-1), х400. D - подвійне імунофлуоресцентне фарбування у нормальній (1) та раковій (2) тканині. х400.

Вивчення експресії p53 в тканинах молочної залози виявило їх відсутність як в нормі, так і в частині злоякісних зразків (рис. 1.5).

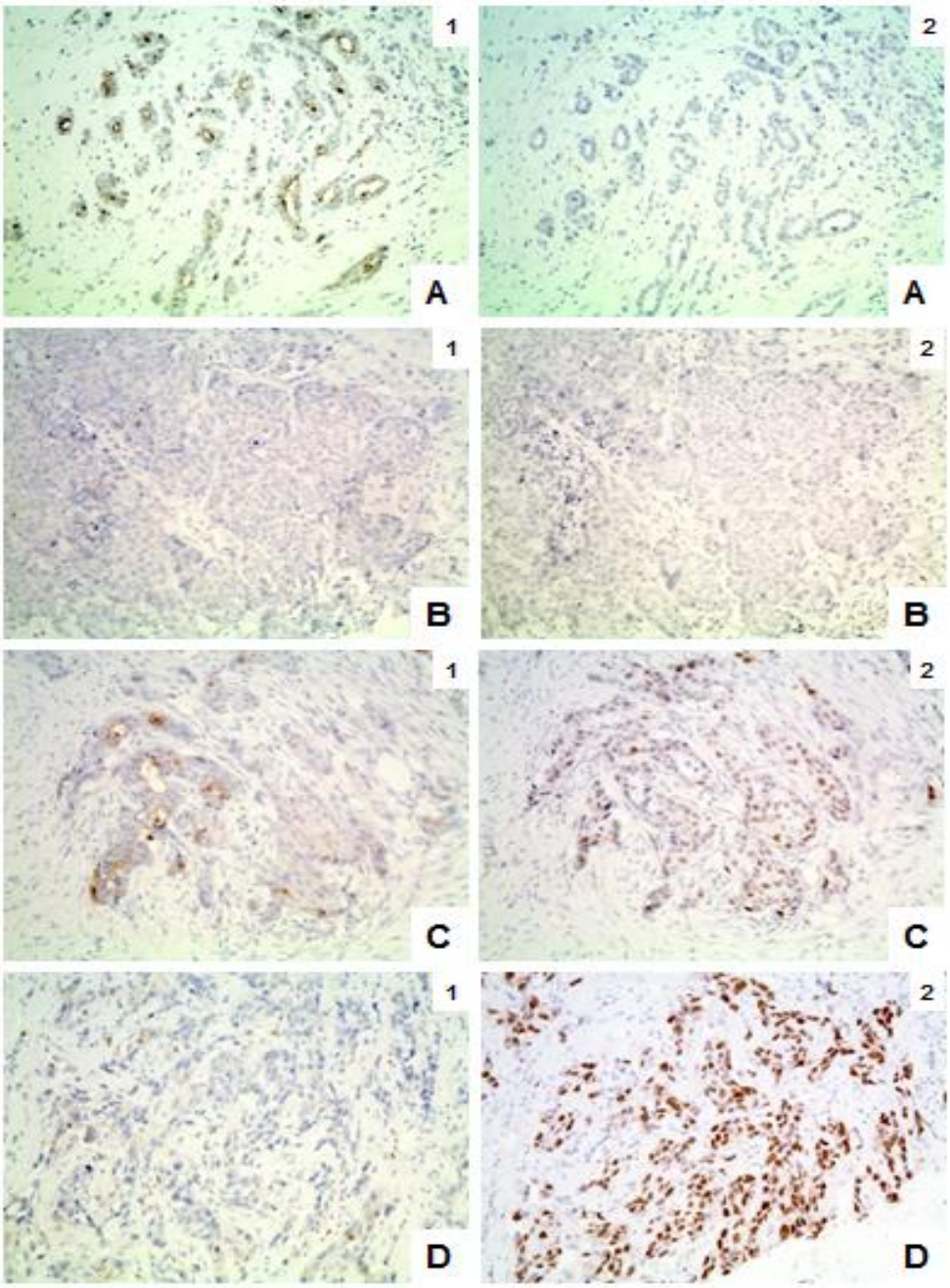


Рисунок 1.5 – Серійні відділи тканин раку молочної залози. Позитивна (A) і негативна (B) експресія CEACAM1 без експресії p53. Позитивна (C) та негативні (D) експресія CEACAM1з експресією p53. Імуногістохімічне дослідження рецепторів CEACAM1 (1) та p53 (2). Збільшення x200.

Не було виявлено кореляції між наявністю CEACAM1 та p53 у різних типах тканин молочної залози. Важливо зазначити, що пухлинні тканини з

цитоплазматичними, мембранними та без CEACAM1 мали різні ядерні вираження p53. З одного боку, серійні розрізи дозволяють знайти їх як у позитивних, так і в негативних неопластичних зонах CEACAM1. З іншого боку, зміни прояву CEACAM1 не супроводжувалися подібними варіантами експресії p53. Нарешті, їх різнобічний вплив на прогресування пухлини було доведено у випадках з мономорфною експресією p53, коли всі ракові клітини були негативними або позитивними. Навіть у цих зразках були визначені ділянки з гетерогенною експресією CEACAM1.

Імуногістохімічно було зазначено, що як нормальні, так і злоякісні тканини молочної залози мали виражений VEGF. Вони були представлені позитивними гранулами DAB в цитоплазмі (рис. 1.6). Нормальна тканина мала переважно перинуклеарну локалізацію VEGF на апікальній стороні просвітницьких клітин. Неопластичні клітини втратили цю властивість, проявляючи дифузну локалізацію VEGF у своїй цитоплазмі. Більшість пухлин мали помірну та сильну кількість VEGF, хоча частина з них мала слабку експресію або навіть їх відсутність. Незважаючи на це, позитивні клітини VEGF були виявлені в різній пропорції серед запального інфільтрату та всередині судин, які були представлені різними типами лейкоцитів. Серійні зрізи дозволили виявити кореляцію між виразами CEACAM1 та VEGF. З одного боку, це було підтверджено наявністю VEGF у CEACAM1 позитивних та негативних випадках, з іншого боку частина позитивної тканини CEACAM1 була негативною на VEGF. Крім того, навіть гетерогенні новоутворення CEACAM1 часто мали схожу експресію VEGF.

На жаль, ми не знайшли прямих зв’язків між експресіями CEACAM1 та VEGF в ендотеліальних клітинах внутрішньопухлинних судин. Незважаючи на те, що переважна їх кількість була позитивно VEGF, лише деякі з них експресували рецептори CEACAM1.

Нормальна тканина молочної залози містила поодинокі позитивні клітини Ki-67. Деякі лімфоцити в навколишній стромі також експресують рецептори Ki-67.

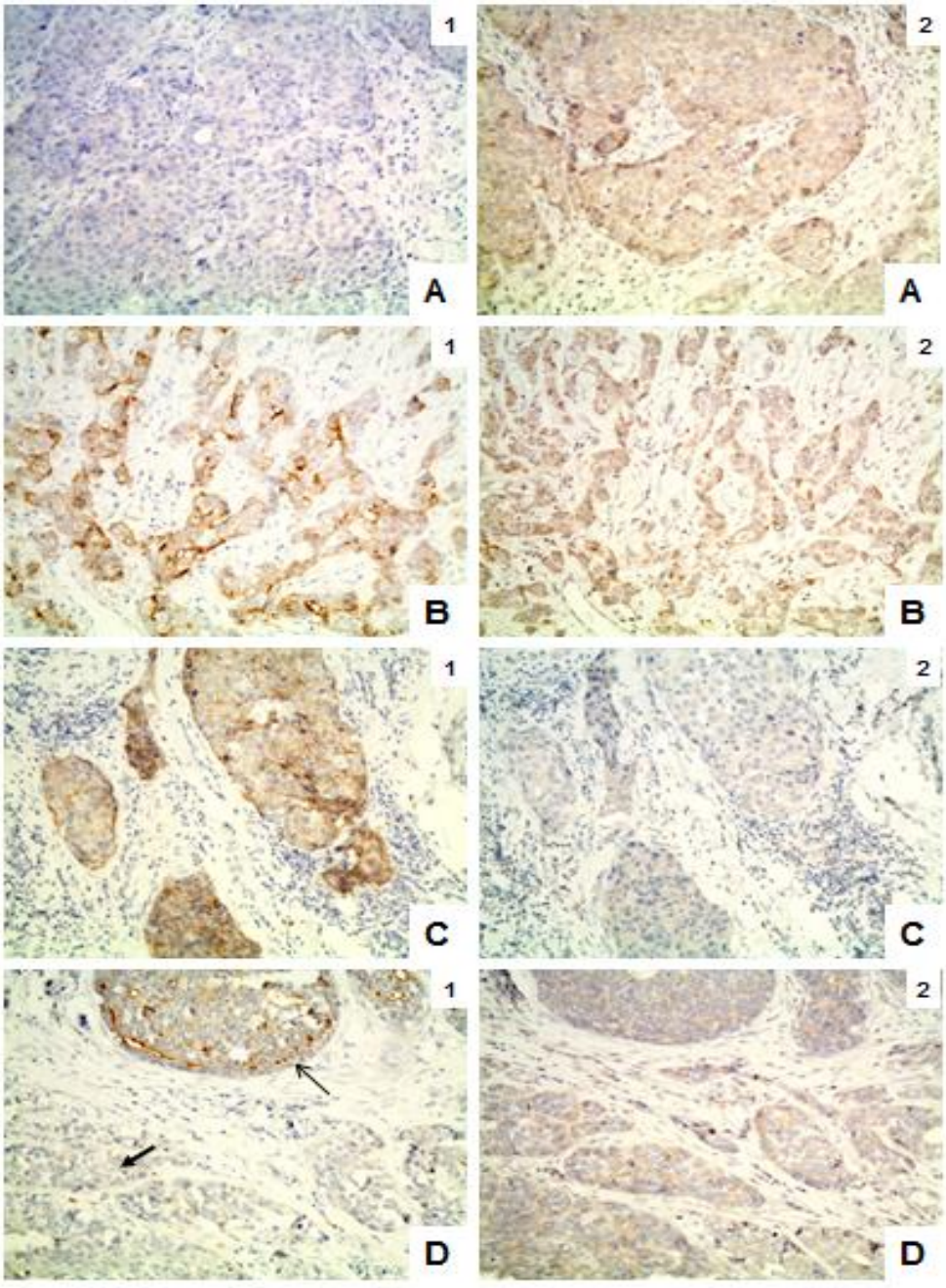


Рисунок 1.6 – Серійні зрізи тканин раку молочної залози. Пухлинна тканина CEACAM1 (A) негативна та CEACAM1 позитивна (B) з експресією VEGF. C - позитивна пухлинна тканина CEACAM1 без експресії VEGF. D - випадок раку молочної залози з гетерогенною експресією CEACAM1 та мономорфною експресією VEGF. Імуногістохімічне дослідження CEACAM1 (1) та VEGF (2). Збільшення x200.

У тканинах пухлини ми виявили різні пропорції проліферативних клітин (рис. 1.7). Їх кількість коливалася від одиничних позитивних клітин до

майже всіх. Подібно до випадків непошкоджених молочних залоз, частина стромальних клітин також була позитивною для Ki-67.

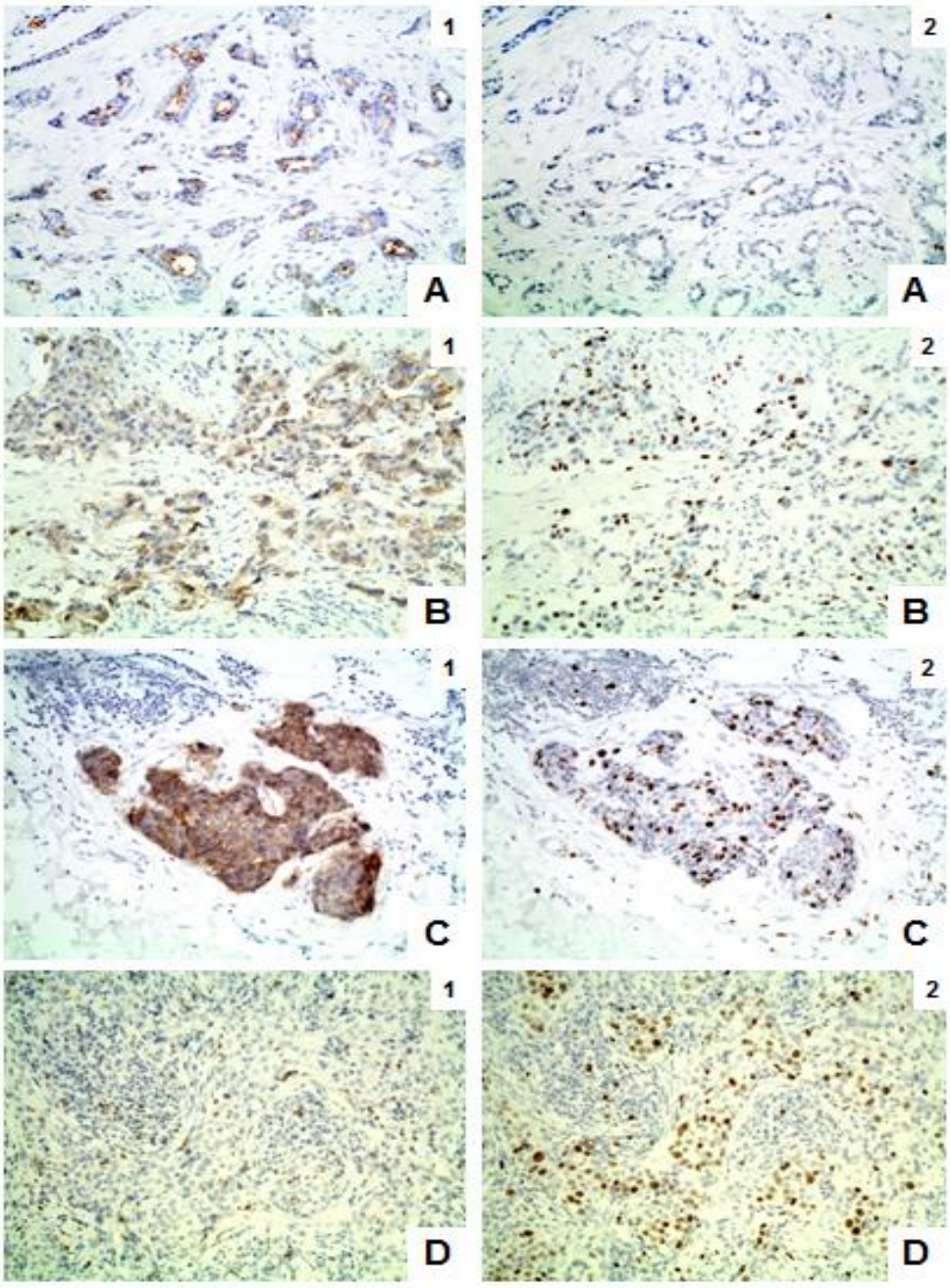


Рисунок 1.7 – Серійні відділи тканин раку молочної залози. Випадки пухлинної тканини мають апікальну мембрану (A), всю мембрану (B), переважно цитоплазматичну (C) та без (D) експресії CEACAM1. Імуногістохімічне дослідження CEACAM1 (1) та Ki-67 (2). Збільшення x200.

Глибокий аналіз серійних та подвійних забарвлених ділянок дозволив виявити сильний вплив існування CEACAM1 на проліферативну активність

неопластичних клітин. Тканина з апікальною локалізацією CEACAM1 (рис. 1.7) містила найменшу кількість позитивних клітин Ki-67, що наближалися до контрольних показників. Їх транслокація по всій поверхні клітини та в цитоплазму супроводжувалася посиленням проліферативної активності пухлини (рис. 1.8). Незважаючи на це, найбільша частка позитивних клітин Ki-67 виявлена в тканині негативної CEACAM1 пухлини.

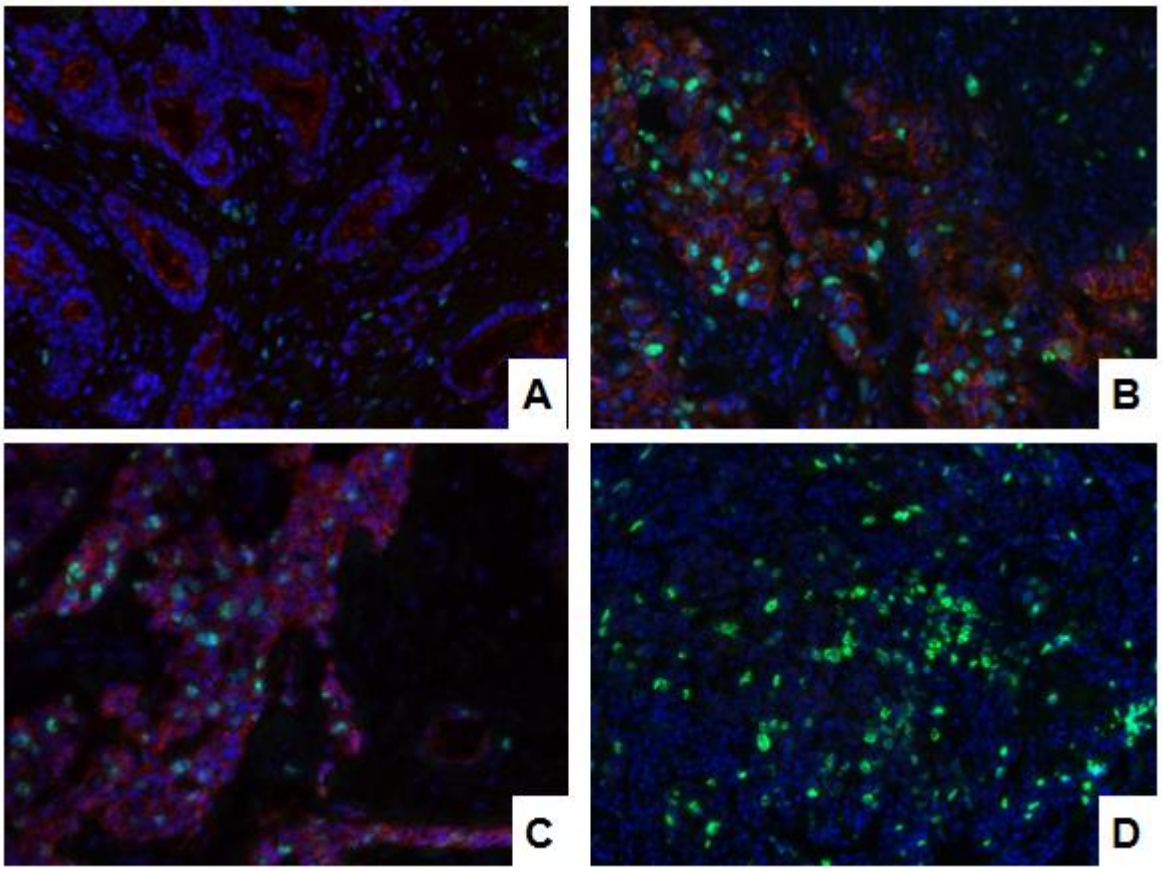


Рисунок 1.8 – Рак молочної залози. Випадки пухлинної тканини мають апікальну мембрану (A), всю мембрану (B), переважно цитоплазматичну (C) та без (D) експресії CEACAM1. Подвійне імунофлуоресцентне фарбування (CEACAM1 - червоний, Ki-67 - зелений, DAPI - синій). Збільшення x200.

Незважаючи на статистичну перевірку зв’язків між виразами CEACAM1 та Ki-67, точні докази ми отримали лише у гетерогенних пухлинах CEACAM1. З одного боку, неопластична тканина молочної залози без CEACAM1 мала значно більшу кількість рецепторів Ki-67 порівняно з позитивними фокусами CEACAM1. З іншого боку, навіть у CEACAM1

позитивної тканини області з більш сильним DAB-сигналом мали меншу кількість позитивних клітин Ki-67. Нарешті, варіації експресії CEACAM1 в одній структурі пухлини відбилися на проліферативній активності неопластичних клітин: збільшення проліферативних клітин при зменшенні існування CEACAM1.

2 ВСТАНОВЛЕННЯ ПРОГНОСТИЧНОГО ЗНАЧЕННЯ ЕКСПРЕСІЇ CEACAM1, CEACAM5 ТА CEACAM6 У ТКАНИНІ ЕНДОМЕТРІЮ

Експресію CEACAM1 незалежно від фази менструального циклу було виявлено на апікальній поверхні люмінального та залозистого епітелію нормального ендометрію. Безперервне розташування CEACAM1 на оберненій у просвіт порожнини матки та ендометріальних залоз поверхні клітин створювало враження бар'єру між зовнішнім середовищем та організмом жінок. Слід зазначити, що суцільне розташування CEACAM1 виявлено також на поверхні секретованих ендометріальними клітинами везикулах (рис. 2.1). Крім того, значна кількість (але не всі) судин як ендометрію, так і міометрію були CEACAM1 позитивними. Позитивним контролем взаємодії anti-CEACAM1 мишачі mAb C5-1X/8 з рецепторами клітин ендометрію були внутрішньо-судинні та тканеві лейкоцити, частина з яких експресувала CEACAM1.

Експресія CEACAM5 рецепторів не була виявлена у тканині нормального ендометрію. Використання високочутливих anti-CEACAM6 mouse mAb 1H7-4B дозволило встановити CEACAM6 рецепторів на апікальній поверхні епітеліальних клітин окремих ендометріальних залоз. Позитивним внутрішнім контролем для anti-CEACAM6 антитіл слугували також внутрішньо-судинні та тканеві лейкоцити.

Імуногістохімічне дослідження CEACAM1 рецепторів у ендометріальних карциномах показало гетерогенне їх розташування у пухлинній тканині. Для ендометріоїдних аденокарцином була притаманна апікальна їх локалізація на внутрішній поверхні епітеліальних клітин при формуванні ними залозистих структур (low-grade tumors).

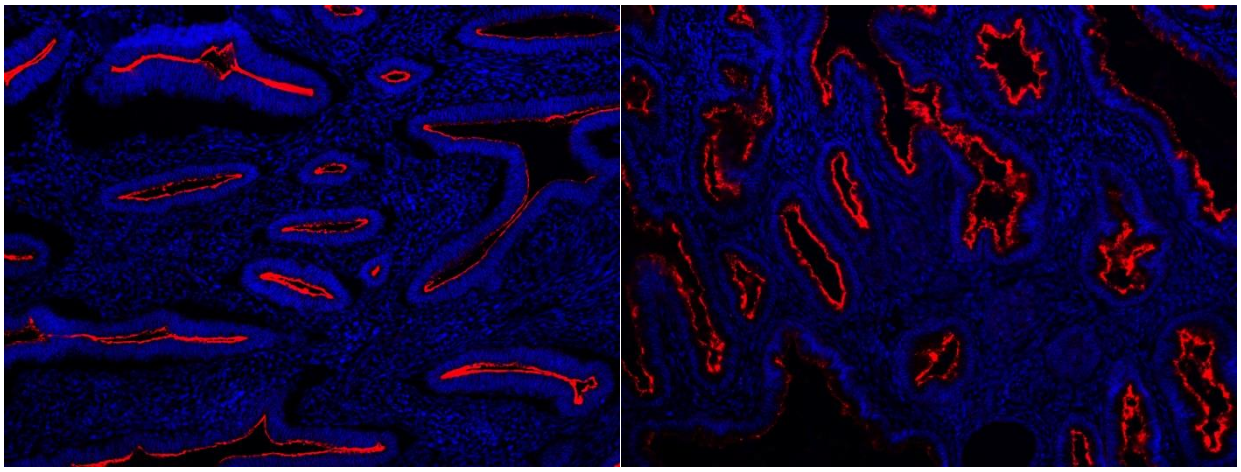


Рисунок 2.1 – Нормальний ендометрію. Імунофлуоресцентне забарвлення (CEACAM1 - червоний, DAPI - синій). Збільшення х200.

У міру дедиференціювання неоплазій (зникнення залозистих формувань та наростання солідних ділянок) відбувалося як зникнення CEACAM1 з поверхні клітин, так і вогнищева їх експресія у цитоплазмі пухлинних клітин (рис. 2.2).

Для серозних та світлоклітинних ендометріальних карцином були влістиві всі чотири варіанти експресії CEACAM1 рецепторів: апікальний патерн, по всій мембрані, цитоплазматичний патерн та відсутність CEACAM1 у пухлинних клітинах (рис. 2.3). Як і у нормальній тканині CEACAM1 експресія окремими судинами та лейкоцитами били внутрішнім контролем якості імуногістохімічного дослідження.

Щодо CEACAM5 та CEACAM6 рецепторів, то результати виявилися наступними – лише окремі випадки ендометріоїдних карцином мали фокусну мембранно-цитоплазматичну експресію CEACAM5 та CEACAM6 рецепторів, окремі випадки серозних та світлоклітинних карцином були CEACAM5 та CEACAM6 позитивними (рис. 2.4).

Експресія CEACAM6 виявлена лише за умови експресії CEACAM1 рецепторів – CEACAM6 рецептори ніколи не експресувалися CEACAM1 негативною пухлинною тканиною. До того ж CEACAM5 експресія спостерігалась виключно у частини CEACAM6 позитивних епітеліальних

клітин. Лейкоцити з CEACAM6 рецепторами були позитивним внутрішнім контролем для anti-CEACAM6 мишачих mAb 1H7-4B у пухлинній тканині.

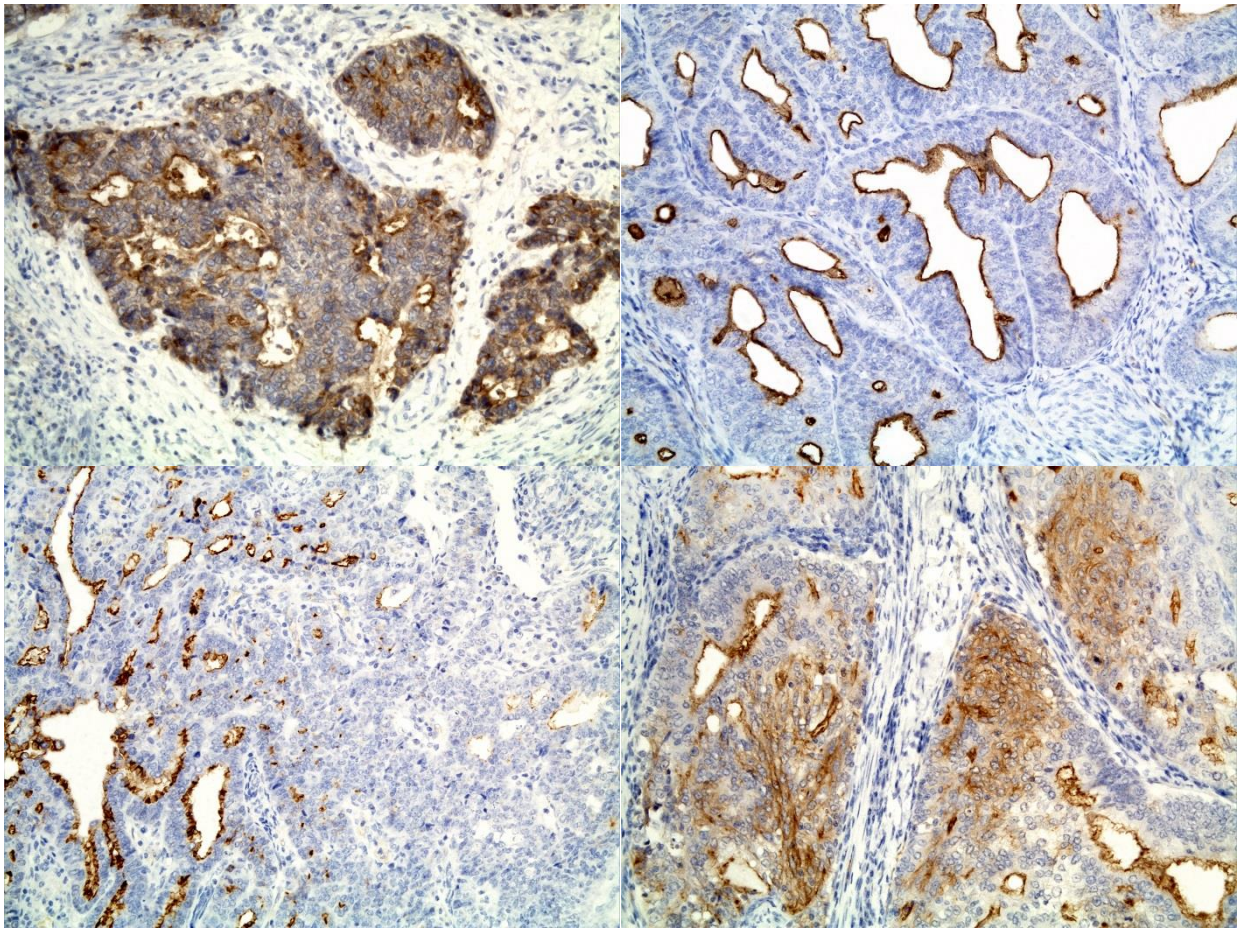


Рисунок 2.2 – Ендометріальна карцинома. Імуногістохімічне дослідження рецепторів до CEACAM1. Збільшення х200.

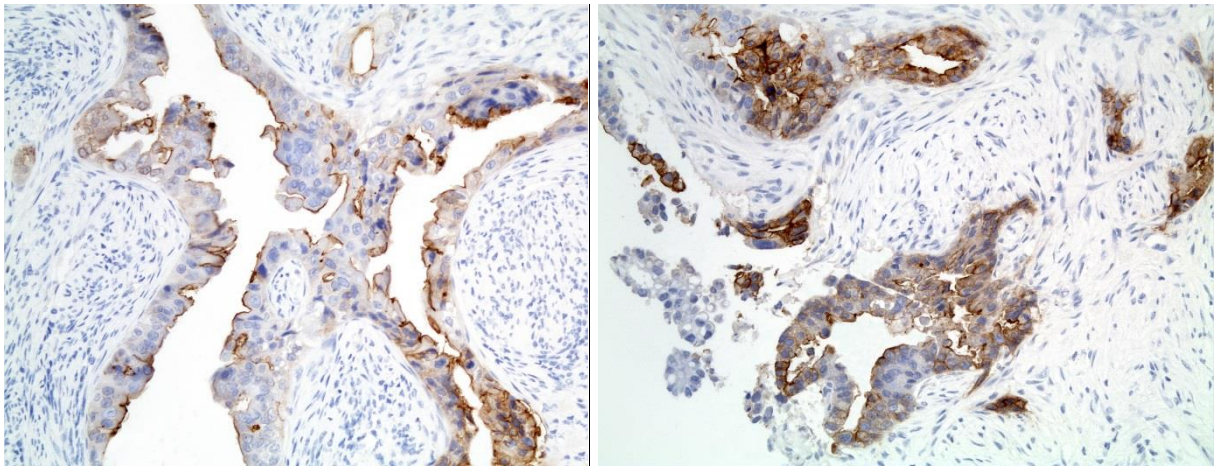
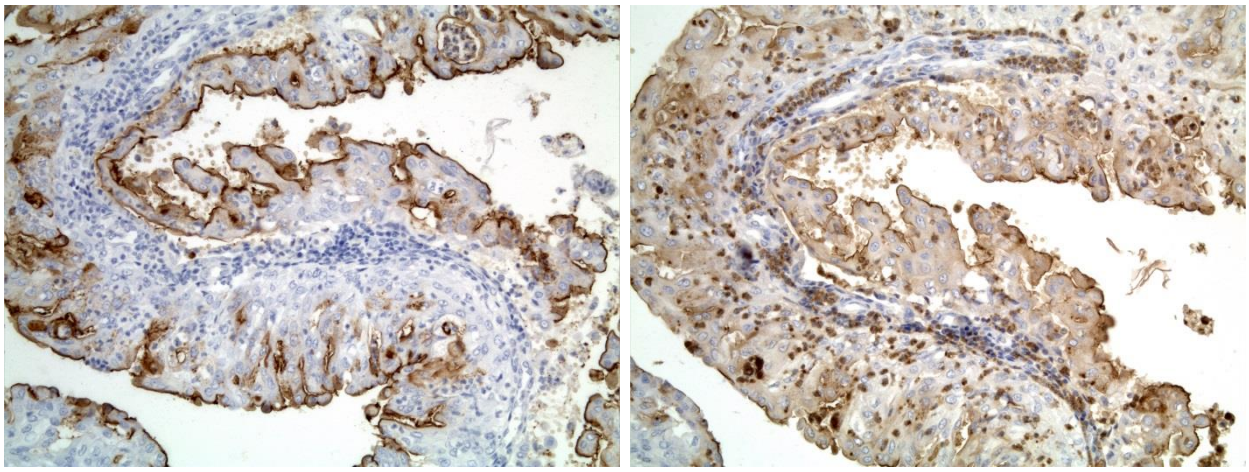


Рисунок 2.3 – Серозна ендометріальна карцинома. Імуногістохімічне дослідження рецепторів до CEACAM1. Збільшення х200.



А Б

Рисунок 2.4 – Серозна ендометріальна карцинома. Імуногістохімічне дослідження рецепторів до CEACAM5 (А) та до CEACAM6 (Б). Збільшення х200.

Враховуючи епізодичність експресії CEACAM5 та CEACAM6 рецепторів епітеліальними клітинами нормального та пухлинного ендометрію, можливості встановлення їх участі у гормональній та проліферативній активності клітин ми не мали. Відповідно, всі подальші дослідження були направленні виключно на встановленні участі CEACAM1 у цих процесах.

Нормальний ендометрій характеризувався варіабельною експресією ER та PR на різних стадіях менструального циклу як у епітеліальних клітинах, так і стромі. Відбувається поступове пригнічення їх експресії покровними та залозистими клітинами ендометрію у стадії секреції. Загалом, основні особливості чутливості ендометрію до статевих гормонів протягом менструального циклу відповідали даним, отриманими Godinjak Z. та Bilalovic N. [1].

Ендометріоїдні карциноми у всіх випадках були стероїд-позитивними. Спостерігалась тенденція до зменшення інтенсивності експресії ER та PR в окремих ділянках солідної будови карцином та у міру прогресування поліморфізму неопластичних клітин. Серозні та світлоклітинні

ендометріальні карциноми мали менший ступінь вираженості ER та PR – виявлено вогнищеву їх експресію у частини серозних пухлин, всі світлоклітинні карциноми були стероїд-негативними. Слід зазначити, що незалежно від чутливості пухлинних клітин до естрогену та прогестерону, стромальний компонент новоутворення та навколишня інтактна тканина ендометрію та міометрію у більшості випадків експресували ER та PR.

Нормальний ендометрій мав різну кількість епітеліальних клітин у стані поділу (з наявністю експресії рецепторів Кі-67) у різні фази менструального циклу. Для фази проліферації притаманні значно вищі показники проліферативної активності клітин (у середньому 18,5%), порівнюючи зі стадією секреції (у середньому 3,5%). У обох фазах циклу виявлено «гарячі» (групи клітин з високою проліферативною активністю) та «холодні» (ділянки з низькою проліферативною активністю клітин) вогнища.

Відсоток клітин з експресією Кі-67 у ендометріальних карциномах значно переважав показники інтактної тканини, хоча проліферативна активність у деяких low-grade ендометріодних карциномах була наближена до інтактного ендометрію стадії проліферації. Відзначено наростання кількості Кі-67 позитивних пухлинних клітин у міру дедиференціювання неоплазій, особливо у солідних ділянках карцином. Серозні та світлоклітинні ендометріальні карциноми постійно мали високі показники проліферативної активності (у середньому 35 та 45% відповідно). Слід зазначити, що окрім епітеліальних клітин (нормальні та пухлинні) у препаратах завжди було виявлено проліферуючі стромальні ендометріальні клітини, інколи їх проліферативна активність була навіть вищою.

Серійні зрізи нормальної та пухлинної тканини ендометрію дозволили встановити особливості ко-експресії CEACAM1 та рецепторів до статевих стероїдних гормонів. У досліджених зразках не виявлено взаємозв’язок між експресією вищезазначених рецепторів. По-перше, як стероїд-позитивний, так і стероїд-негативний нормальний ендометрій (у різні фази менструального циклу) завжди мав суцільну експресію CEACAM1 на

апікальній поверхні епітеліальних клітин (рис. 2.5). По-друге, у частини ендометріоїдних карцином з монотонною позитивною експресією ER and PR (з 100% рецептор-позитивних клітин) спостерігалась гетерогенна експресія CEACAM1 (рис. 2.6). По-третє, деякі випадки серозної та світлоклітинної ендометріальних карцином з відсутньою експресією ER та PR мали вогнищеву позитивну експресію CEACAM1.

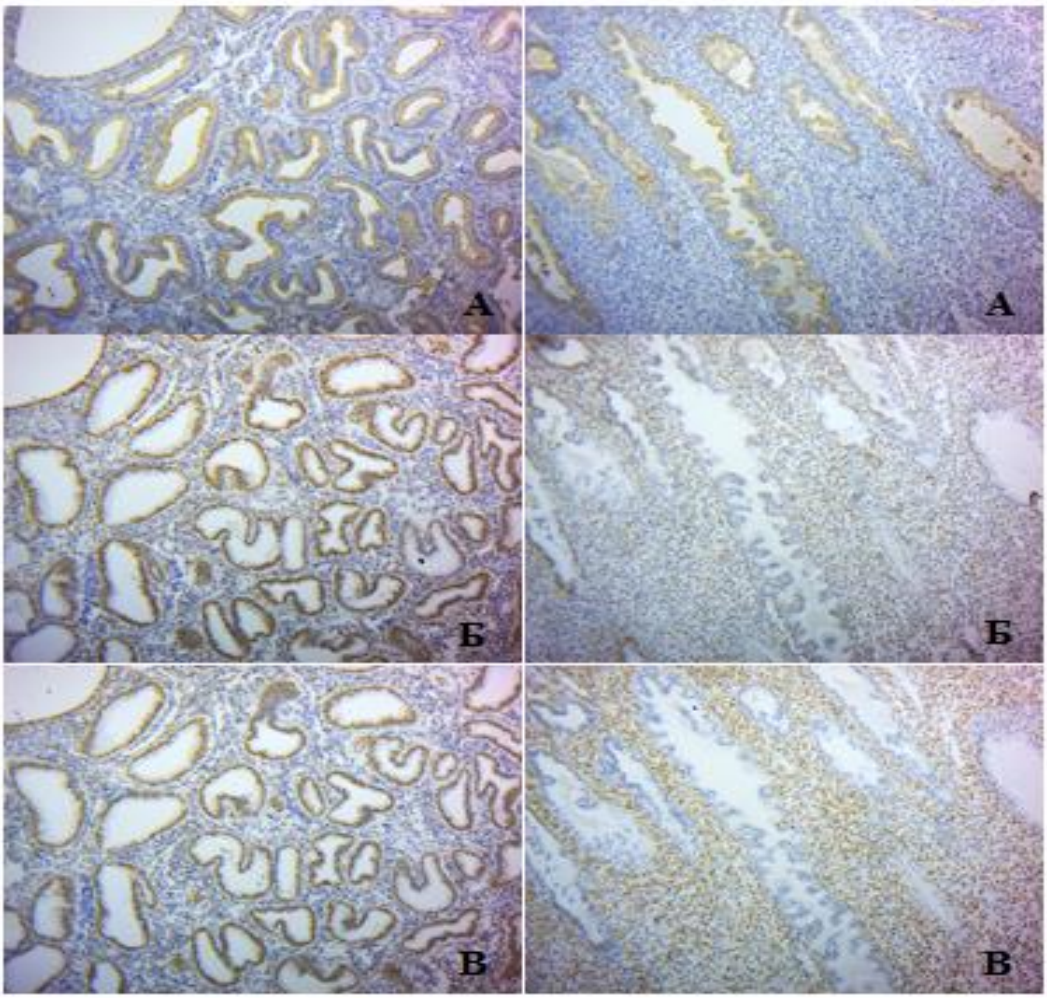


Рисунок 2.5 – Нормальний ендометрій. Імуногістохімічне дослідження рецепторів до CEACAM1 (А), ER (Б) та PR (В). Збільшення х100.

Досліджуючи нормальний ендометрій на предмет наявності взаємозв’язку між проліферотивною активність клітин та експресією CEACAM1, нам не вдалося виявити їх взаємовпливу. Це пов’язано з рідкістю розташування проліферуючих клітин. Натомість, повністю протилежні

результати було отримано при аналізі імуногістохімічного дослідження серійних зрізів тканини ендометріальних карцином.

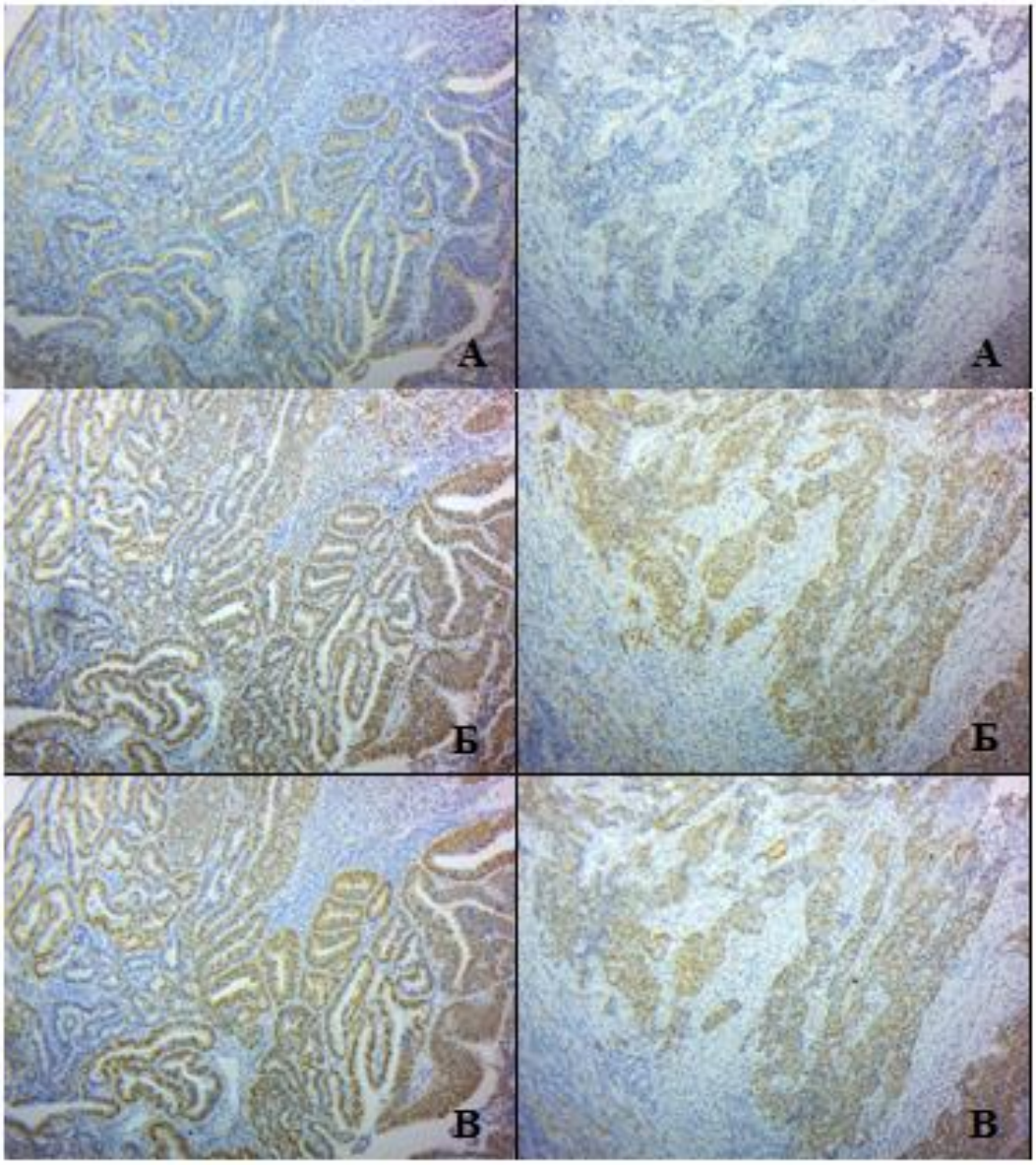


Рисунок 2.6 – Ендометріальна карцинома. Імуногістохімічне дослідження рецепторів до CEACAM1 (А), ER (Б) та PR (В). Збільшення х100.

Вогнища неоплазій з експресією CEACAM1, незалежно від їх патерну у клітинах, мали значно нижчі показники інтенсивності поділу ракових клітин (менший відсоток Кі-67 позитивних клітин) (рис. 2.7).

Серед CEACAM1 позитивних випадків найнижчі показники проліферативної активності було виявлено за умови апікальної їх експресії.

Ключові підтверджуючі результати було отримано при дослідженні гетерогенної (щодо експресії CEACAM1) неопластичної тканини.

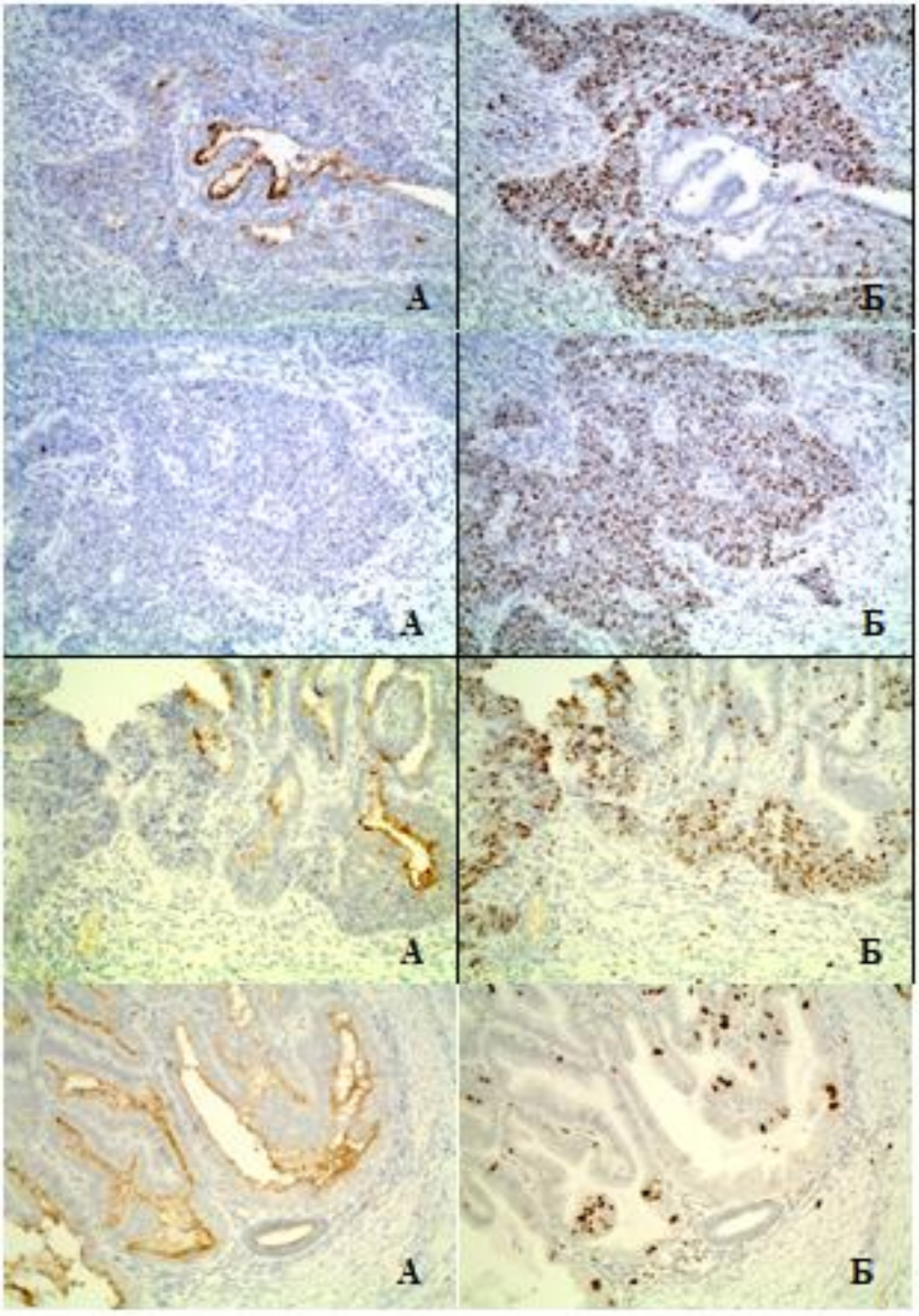


Рисунок 2.7 – Ендометріальна карцинома. Імуногістохімічне дослідження рецепторів до CEACAM1 (А) та Кі-67 (Б). Збільшення хБ00.

Кількість Ki-67 позитивних клітин була значно більшою у ділянка без експресії CEACAM1. Остаточно інгібуючий вплив CEACAM1 на проліферативну активність неопластичних клітин був доведений при double immunofluorescence staining з використанням мишачих anti-CEACAMs та кролячих anti-Ki-67 mAbs (рис. 1.8). «Гарячі» проліферативні ділянки ендометріальних карцином були CEACAM1 негативними, у порівнянні з «холодними» вогнищами пухлини, які у переважній більшості експресували CEACAM1.

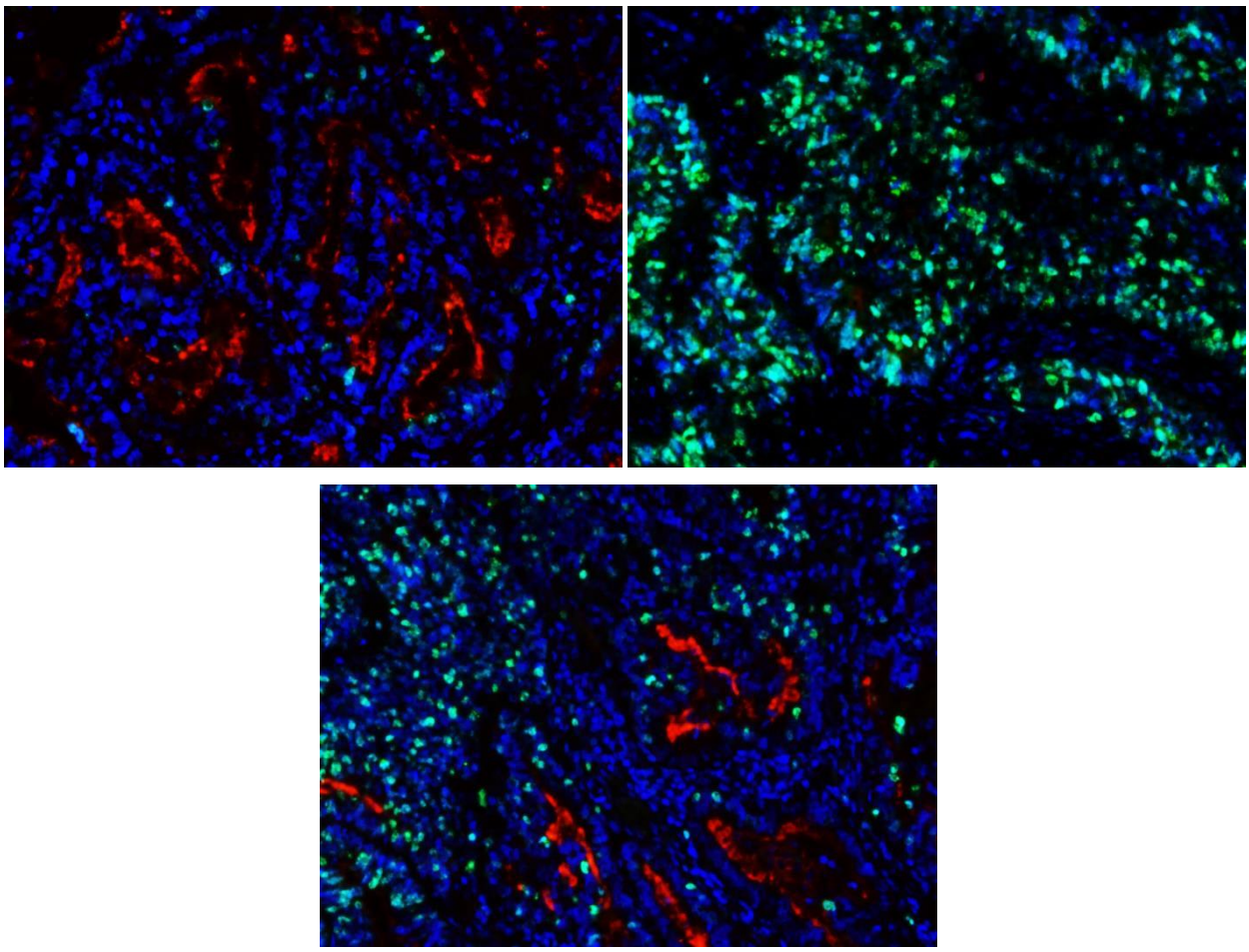


Рисунок 2.8 – Ендометріальна карцинома. Подвійне імунофлуоресцентне забарвлення (CEACAM1 - червоний, Ki-67 - зелений, DAPI - синій). Збільшення x200.

3 ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ ВПЛИВУ ПРОСТАТОЛІТІВ ТА CORPORA AMYLACEA НА ІМУНОФЕНОТИП РАКУ ПЕРЕДМІХУРОВОЇ ЗАЛОЗИ

Під час гістологічного дослідження зразків усіх досліджуваних груп було підтверджено, що всі вони відповідали дрібноацинарній аденокарциномі передміхурової залози і відповідали 7-9 ступеню за Глісоном. Гістологічний аналіз тканини РПЗ контрольної групи (без інтралюмінальних включень) виявив, що пухлинні залози сформованих атиповими клітинами з гіперхромними ядрами, з формуванням псевдоацинарних та трабекулярних структур, між ними розміщувався стромальний компонент з пухлинними клітинами, розміщеними у вигляді ланцюгів та «цугів». Більша частина залоз не мали просвіту, часто зразки даної групи були представлені виключно пухлинним полем, хоча помітна частина залоз мала просвіт.

Зразки груп РПЗ (П та СА) характеризувалися наявністю внутрішньопросвітних включень в пухлинних залозах. Ці включення мали вигляд округлих утворень, які повторювали форму просвіту залози.

У тканині групи П включення були представлені гомогенними утвореннями, які мали округлу чи полігональну форму. Частина простатолітів пошкоджувалася під час виготовлення гістологічних препаратів і виявлялася у вигляді осколків або грубих фрагментів неправильної форми. Їхній колір варіював від світло-жовтого до брунатного (рис. 3.1).

У зразках тканини групи СА інтралюмінальні включення були представлені напівпрозорими, переважно округлої форми, утвореннями. Вони розміщувалися поодиноко. Ці інтралюмінальні включення мали шарувату структуру, часто повторювали форму залоз та мали рожево-фіолетове забарвлення.

У оточуючих тканинах навкруги інтралюмінальних включень визначалися вогнища хронічного запалення, крововиливи, кістозна трансформація залоз та вогнища некрозів.

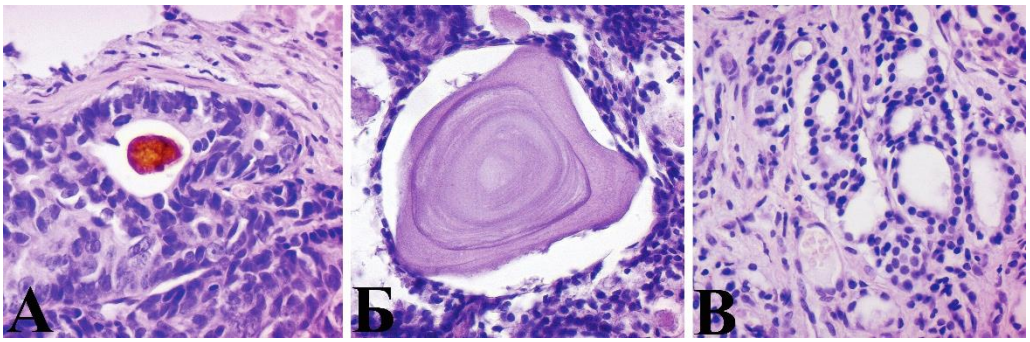


Рисунок 3.1 – Гістологічне дослідження РПЗ. А – РПЗ з простатолітами; Б – РПЗ з СА; В – РПЗ контрольної групи. Забарвлення гематоксилін-еозином. Збільшення х400.

Для визначення верифікації природи інтралюмінальних включень препарати РПЗ були забарвлені за допомогою алізаринового червоного, фон Косса та конго червоним. У структурі простатолітів (група П) виявлялись солі кальцію (позитивне забарвлення алізариновим червоним) у формі фосфатів кальцію (позитивне забарвлення за фон Коссом) (рис. 2 А, 2 Б). Також було встановлено присутність підвищеної концентрації кальцію у тканинах, що прилягали до простатолітів. У структурі СА за допомогою обох зазначених методів сполук кальцію виявлено не було.

Вивчення структури та хімічного складу простатолітів проводилося за допомогою SEM/EDS. Дослідження проводилося на виявлених макроскопічних конкрементах (діаметром більше за 1 мм). Отримані дані свідчать про те, структура даних інтралюмінальних включень є неоднорідною з наявністю хвилястих нашарувань (рис. 3.2). Між цими нашаруваннями присутня безструктурна речовина. Це свідчить про циклічність процесів літогенезу у передміхуровій залозі. Результати проведеного енерго-дисперсійного спектроскопічного дослідження вказують на значний вміст кальцію та фосфору у складі простатолітів у співвідношенні

1:1,67, що є характерним для гідроксиапатиту. Також було виявлено незначні домішки сторонніх елементів (калій та цинк) у мінеральному компоненті простатичних конкрементів.

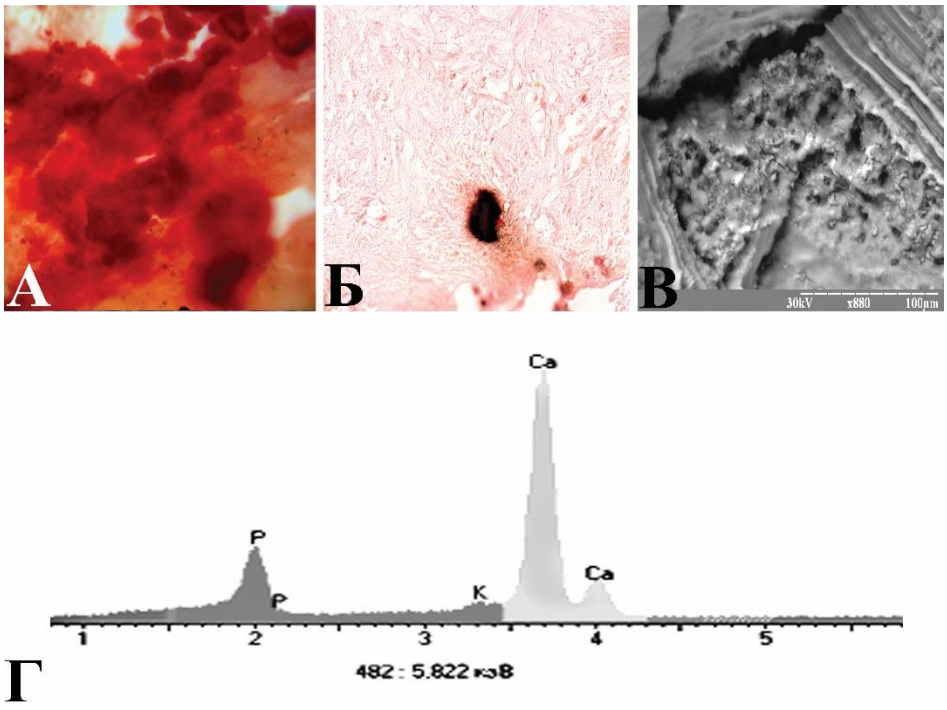


Рисунок 3.2 – Дослідження тканини РПЗ з простатолітами. А – забарвлення алізариновим червоним, збільшення х400; Б – забаравлення за фон Косса, збільшення х400; В – скануюча електронна мікроскопія, збільшення вказане у правому нижньому куті зображення; Г – результати енерго-дисперсійної спектроскопії.

Вивчення складу СА проводилося за допомогою забарвлення препаратів конго червоним. У світлому полі СА мали вигляд вираженo-червоних об’єктів, які контрастували із оточуючими тканинами (рис. 3.3). Дослідження препаратів у поляризаційному світлі виявило феномен світіння «зеленого яблука» та «мальтійського хреста», які є характерними для амілоїду. Це доводить, що основним структурним компонентом СА є амілоїд.

При імуногістохімічному дослідженні AR у пухлинних клітинах та клітинних елементах пухлинної строми мали ядерну локалізацію забарвлення (рис. 3.4). Оцінка рівнів експресії AR не виявила статистично значимої

різниці показників між РПЗ груп П та СА і у порівнянні з контролем. У групі П було виявлено в середньому 347,22±53,93 позитивних клітин, у групі СА - в середньому було виявлено 381,17±21,47 імунопозитивних клітин. Показник контрольної групи складав 421,02±32,82 позитивних клітин у одиниці полі зору. Таким чином, не було встановлено залежності експресії AR як від присутності інтралюмінальних включень, так і від їх природи.

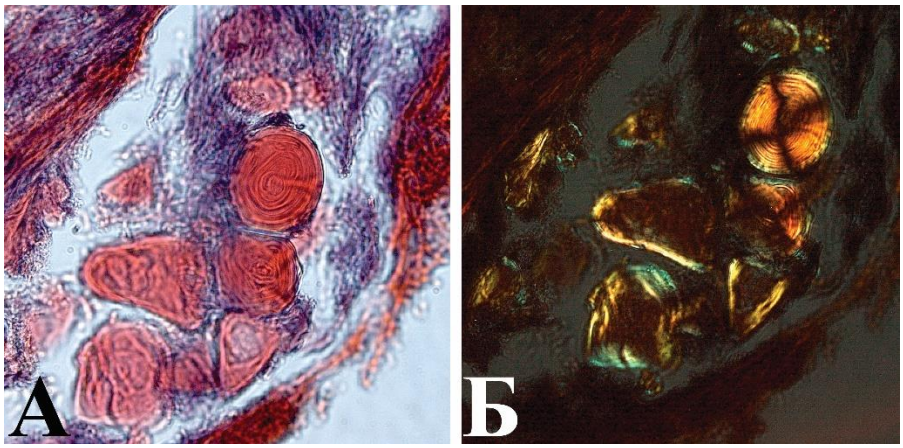


Рисунок 3.3 – Гістохімічне дослідження тканини РПЗ із СА. А – забарвлення конго червоним, світле поле; Б – забарвлення конго червоним, поляризаційне світло. Збільшення х400.

При імуногістохімічному дослідженні AR у пухлинних клітинах та клітинних елементах пухлинної строми мали ядерну локалізацію забарвлення (рис. 3.4). Оцінка рівнів експресії AR не виявила статистично значимої різниці показників між РПЗ груп П та СА і у порівнянні з контролем. У групі П було виявлено в середньому 347,22±53,93 позитивних клітин, у групі СА - в середньому було виявлено 381,17±21,47 імунопозитивних клітин. Показник контрольної групи складав 421,02±32,82 позитивних клітин у одиниці полі зору. Таким чином, не було встановлено залежності експресії AR як від присутності інтралюмінальних включень, так і від їх природи.

Апоптичний потенціал пухлинної тканини був досліджений за допомогою рівнів експресії протеїнів p53, Casp3 та Bax. Маркер p53 мав ядерний характер експресії та помірну інтенсивність (рис. 3.4). Було виявлено, що присутність даного маркера статистично не відрізнялася у всіх

групах РПЗ (П, СА та К). Так, у групі П в середньому було виявлено 40,17±4,38 p53-позитивних клітин, у зразках групи СА виявлялося в середньому 39,76±2,77 позитивних клітин, показник контрольної групи складав 36,48±2,46 імунопозитивних клітин. Отже, експресія p53 не залежить ні від присутності інтралюмінальних включень, ні від їх природи.

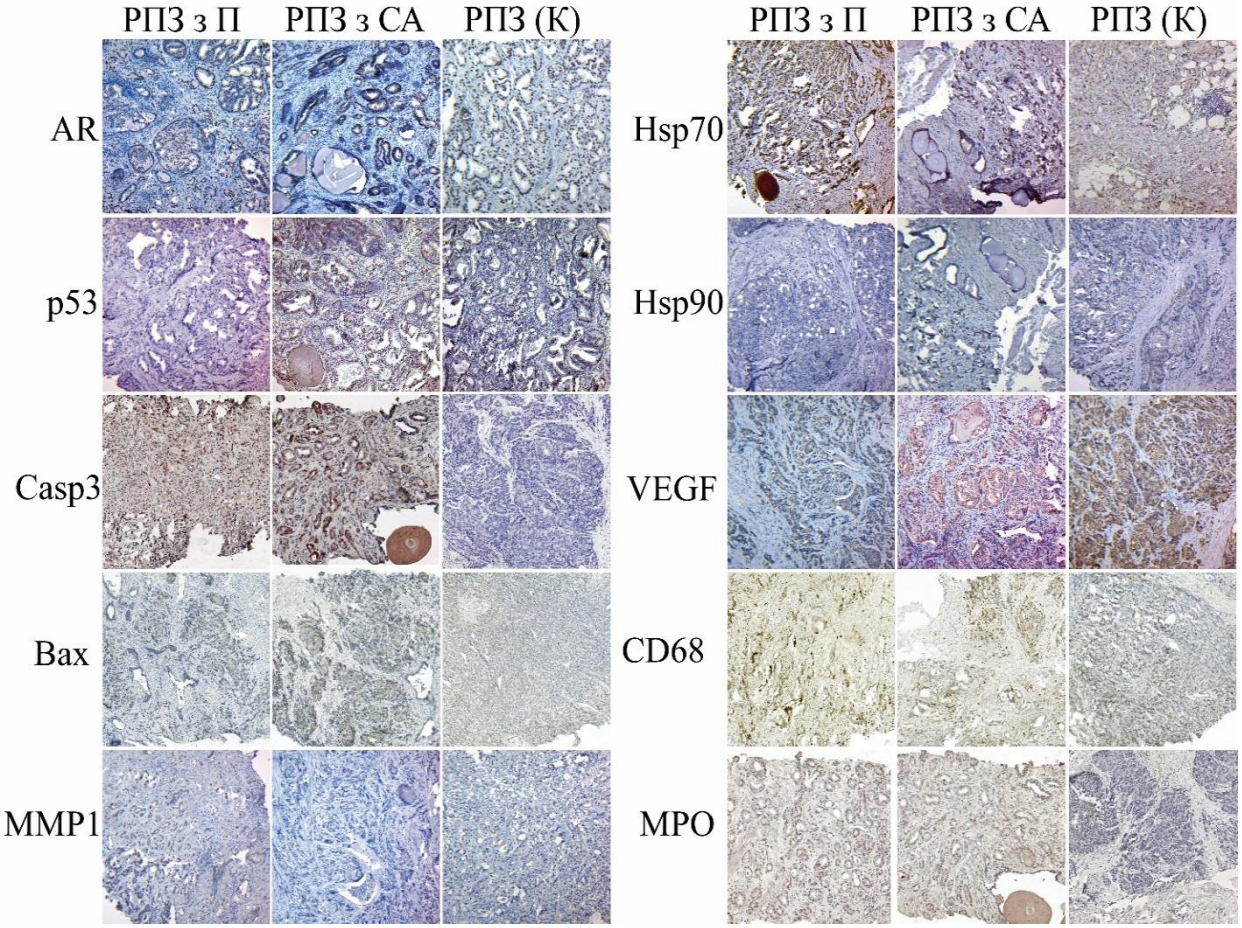


Рисунок 3.4 – ІГХ дослідження РПЗ із простатолітами, СА та пухлин контрольної групи.

У тканині РПЗ з інтралюмінальними включеннями (група П та СА) було виявлено достовірно вищий рівень експресії Casp3. Так, у групі П в середньому було виявлено 55,37±4,12 Casp3-позитивних клітин, у групі СА – 48,67±2,81 клітин, а у контрольній групі 31,88±1,79. Таким чином встановлено, що рівень експресії Casp3 в РПЗ залежить виключно від присутності інтралюмінальних включень ($p<0,001$) та не залежить від їх структури. Подібна тенденція була виявлена і для іншого проапоптотичного

маркеру – Bax протеїну. Під час ІГХ детекції він мав цитоплазматичний характер локалізації. У тканині РПЗ, що прилягала до інтралюмінальних включень, було виявлено підвищену інтенсивність експресії Bax. Так, у тканині РПЗ з простатолітами в середньому було виявлено 66,59±4,92 Bax-позитивних клітин, у РПЗ із СА – 59,13±3,02, у контрольних зразках 44,61±2,94 клітин. Таким чином, експресія Bax залежить від наявності у тканині РПЗ інтралюмінальних включень ($p<0,01$) та не залежить від їх природи.

MMP1 мала цитоплазматичний патерн експресії (рис. 3.4). У групі П було виявлено 35,38±2,78 MMP1-позитивних клітин, у групі СА – 39,21±1,92 клітин, у контрольній групі – 36,84±1,88 імунопозитивних клітин. Це вказує на те, що інвазивний потенціал пухлини не залежить як від типу інтралюмінальних включень, так і взагалі від їх присутності у тканині РПЗ.

Hsp70 мав цитоплазматичний характер та помірну інтенсивність експресії у всіх групах зразків РПЗ (рис. 3.4). У групі П було виявлено 312,61±21,79 позитивно забарвлених клітин, у РПЗ із СА – 311,78±17,65 клітин та у контрольній групі – 267,73±18,32 клітин в одиниці площі виміру. Таким чином, не виявлено залежності експресії Hsp70 у тканині РПЗ із присутністю інтралюмінальних включень.

Імуногістохімічний маркер Hsp90 мав змішаний ядерно-цитоплазматичний патерн експресії (рис. 3.4). Також Hsp90 виявлявся у структурі СА у вигляді дифузного забарвлення безструктурної речовини між концетрично розміщеними шарами білку. Кількість Hsp90-позитивних клітин у групі П складала 338,58±20,15, у групі СА – 343,8±27,32, у контрольній групі – 434,14±21,36 імунопозитивних клітин. Таким чином, було встановлено, що у тканині РПЗ із інтралюмінальними включеннями (простатоліти та СА) виявляється достовірно нижча кількість імунопозитивних клітин ($p<0.001$). Враховуючи участь даного протеїну у стабілізації просторової структури макромолекул, знижена його присутність у тканині РПЗ із інтралюмінальними включеннями може призводити до

конформаційних змін білків. Це в свою чергу може мати вплив на процеси апоптозу, що було показано вище.

Інтенсивність процесів ангіогенезу у тканині РПЗ була визначена за допомогою оцінки кількості VEGF-позитивних пухлинних клітин (рис. 3.4). У групі П було виявлено 56,47±3,91 VEGF-позитивних клітин, у групі СА – 47,98±2,85, у контрольній групі – 61,46±2,92 клітин. Проведений статистичний аналіз отриманих результатів не вказав на значущу різницю між показниками груп П та СА. Однак, було виявлено присутність інтралюмінальних включень у тканині РПЗ супроводжується зниженням експресії VEGF ($p<0,05$).

CD68 мав змішаний, переважно цитоплазматично-мембранний характер експресії (рис. 3.4). Позитивні клітини розміщувалися дифузно як пухлинній тканині, так і в пухлинній стромі. У безпосередній близькості до інтралюмінальних включень виявлялися макрофаги, що згрупований характер розташування. Так, у групі П було виявлено 134,92±5,8 CD68-позитивних клітин, у групі СА – 138,77±4,25 клітин, у контрольній групі – 92,14±4,12 клітин. Статистичний аналіз не вказав на достовірну різницю результатів між групами П та СА. В той же час, присутність у неопластичній тканині будь-яких інтралюмінальних включень супроводжується розвитком хронічного запалення, що підтверджується достовірно вищою кількістю виявлених макрофагів у тканині РПЗ з інтралюмінальними включеннями у порівнянні з контролем ($p<0,001$).

MPO мала виражений цитоплазматичний патерн експресії та високу інтенсивність сигналу (рис. 3.4). MPO-позитивні клітини розміщувалися як поодиноко, так і у вигляді груп. Їх локалізація переважно відповідала вогнищам запалення та некрозів. Таким чином, як і для CD68-позитивних клітин, кількість нейтрофілів у тканині РПЗ залежить від присутності інтралюмінальних включень ($p<0,001$), а не від їх природи.

5 УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Трансформація пухлин у молочній залозі супроводжується зміною різноманітних маркерів крові та тканин. Високий рівень захворюваності та смертності від РМЗ провокує пошук нових діагностично-терапевтичних показників або більш глибокого дослідження їх існуючих параметрів. Дослідження CEACAM1 - перспективний напрямок для цієї мети. Вони були виявлені в різних нормальних органах і типах клітин, беручи участь у їх функціонуванні. Регулюючи життєво важливі процеси, CEACAM1 впливає на перебіг пухлини та метастазування. Незважаючи на докази їх збільшення, зменшення та зникнення в різних органах під час прогресування пухлини, причини цих явищ залишаються нез'ясованими. Більше того, нині поширеною думкою щодо їх впливу на агресивність пухлин є їх відсутність. Такі ж проблеми є і в молочній залозі, де були описані різні напрямки їх зміни.

Перш за все, слід зазначити, що використання мишачого mAb 6G5j є найкращим способом скринінгу позитивних тканин CEACAM. Це дає можливість уникнути марної підготовки імуногістохімічних реакцій для кожного типу CEACAM у 6G5j негативних випадках, оскільки вони є негативними за CEACAM1.

Наші результати підтвердили отримані раніше дані про розподіл CEACAM1 в нормальних дольково-протокових структурах молочної залози. Подібно до результатів групи Рітдорфа, стромальні та внутрішньосудинні гранулоцити зазвичай були позитивними до CEACAM1, а апокринний епітелій - негативним. На противагу цьому дослідженню та іншим, поодинокі судини також були позитивними за CEACAM1.

Трансформація пухлин призвела до зміни форм експресії для CEACAM1 в неопластичних клітинах. Перші стадії зростання злоякісності (рак низького ступеня) супроводжуються апікальною локалізацією CEACAM1 на поверхні люмінальної пухлинної клітини з наступним їх

зникненням одночасно зі зникненням просвітів у пухлинних утвореннях. Іншим напрямком порушення регуляції CEACAM1 було його рівномірне мембранний та цитоплазматичний розподіл у пухлинах запущеної стадії (рак високого ступеня). Крім встановлення експресії CEACAM1 пухлинними клітинами та їх варіацій, основною метою нашого дослідження було пояснення цього явища та знаходження цих даних на практиці. Ми розглядаємо ці зміни CEACAM1 як варіанти антигенної атипії (тип клітинної атипії). З одного боку, дедиференціація пухлини призводить до зниження (зменшення) антигенів, які синтезують нормальні клітини (спрощення антигену). З іншого боку, малігнізація супроводжується синтезом антигенів, специфічних для більш ранніх фаз розвитку плода та синтезу неспецифічних для них антигенів, але ці антигени синтезуються іншими клітинами (антигенна ускладненість: антигенна реверсія та антигенна дивергенція відповідно). Враховуючи цю інформацію, ми можемо пояснити отримані дані. Зниження та зникнення CEACAM1 на перших стадіях розвитку пухлини є проявом антигенного спрощення, коли клітини поступово втрачають можливість продукувати та демонструвати ці білки. Рівномірний мембранний та цитоплазматичний розподіл - це варіанти антигенної ускладненості (антигенна реверсія) з урахуванням їх присутності в цих частинах клітин у першому триместрі ембріогенезу. Більше того, це може пояснити всі інші результати: зниження CEACAM1 у пухлинах тих органів, де вони зазвичай є (спрощення антигену), поява в тих органах, де вони відсутні (антигенне ускладнення) . Навіть дані про їх різну експресію в одному і тому ж органі (включаючи молочну залозу) можна пояснити вивченням різних новоутворень (різних ступенів) або відсутністю врахування закономірностей їх поширення.

Отже, наявність та відсутність CEACAM1 у випадках патології молочної залози не можна розглядати як показники їх злоякісності. Для ідентифікації злоякісного процесу повинні використовуватися лише такі маркери РМЗ, як зникнення CEACAM1 та їх рівномірний мембранний та

цитоплазматичний розподіл. Незважаючи на зміну шаблонів CEACAM1 у пухлинних клітинах, ми також не виключаємо впливу співвідношення ізоформ CEACAM1-S/CEACAM1-L або їх посттрансляційні модифікації на ініціацію та прогресування РМЗ.

Існує кілька напрямків вирішення питання про вплив CEACAM1 на прогресування пухлини та агресивність неопластичних клітин: контроль розповсюдження пухлини в організмі (метастази), перевірка виживання жінок з РМЗ, відповідь на лікування, частота рецидивів, їх експресія в різних пухлинах (різний ступінь злоякісності) та їх спільна експресія з відомими раніше прогностично важливими білками. Ми обрали два останніх варіанти (передостанній був описаний вище).

Серійні зрізи (інкубовані з різними антитілами) та подвійне імунофлуоресцентне фарбування не дозволили виявити взаємозв'язків між CEACAM1 та Е-кадгерином. Незважаючи на дані про адгезивні властивості CEACAM1 та їх участь у підвищенні міцності контактів клітина-клітина та клітина-ECM, їхня незалежність щодо експресії Е-кадгерину виключає ці функції в нормі і злоякісній тканині молочної залози. З іншого боку, їх апікальне існування в нормальному дольково-протоковому епітелії з функцією гомофільної дії (адгезії) призведе до зникнення просвіту через злипання протилежних клітин. Відсутність адгезивних властивостей у досліджуваних тканинах не виключає їх участі у комунікації (включаючи адгезію) з бактеріями та імунними клітинами, які були описані раніше.

Такі самі результати були отримані під час дослідження взаємозв'язків між CEACAM1 та p53. Незважаючи на інформацію про їх вплив на апоптоз, у нашому дослідженні зміна CEACAM1 не супроводжувалась аналогічною зміною p53. Аналогічні дані були отримані під час дослідження CEACAM1 та VEGF. Позитивні та негативні пухлинні клітини CEACAM1 не мали однакового фенотипу для VEGF. На відміну від попередніх робіт ми виявили поодинокі позитивні судини CEACAM1 як у нормальній, так і в злоякісній тканині молочної залози. Хоча зв’язки між експресією CEACAM1 в

ендотеліоцитах під час появи та прогресування пухлини відсутні, це підтвердило їх участь у функціонуванні стінки судин у нормальних та злоякісних тканинах. Наші результати показують відсутність співвиразів CEACAM1 та VEGF у судинах. Це вказує на деякі розбіжності між нашими та раніше отриманими даними, що показало їх зворотну активацію.

На відміну від вищезазначених маркерів, дослідження Ki-67 демонструє сильний вплив CEACAM1 на проліферативну активність пухлинних клітин РМЗ. Існування CEACAM1 супроводжувалося значно нижчим показником проліферативного індексу неоплазій. З одного боку, це підтверджує інформацію про інгібіторний вплив CEACAM1 на проліферативну активність культивованих пухлинних клітин, можливо активуючих рецептор и до інсуліну та епідермального фактора росту, а також Id-1. З іншого боку, отримані дані суперечать іншим дослідженням, які демонструють індуктивний вплив CEACAM1 на проліферацію клітин, а також відсутність їх впливу на швидкість поділу клітин. У позитивних випадках CEACAM1 найнижчий проліферативний показник відзначався у пухлинних клітинах з апікальною експресією. Їх транслокація призводить до посилення ділення клітин, хоча інгібіторний ефект CEACAM1 частково залишається. Серійні зрізи та подвійне імунофлуоресцентне фарбування підтверджують це відкриття, що вказує на сильну залежність агресивності пухлини від присутності CEACAM1. Більше того, це дало нам можливість розпізнати їх взаємозв'язки в гетерогенних пухлинах, де тканина перебувала в однаковому стані (внутрішній та зовнішній вплив), але мала різну експресію CEACAM1 та Ki-67.

Дослідження тканини ендометрію підтвердило наявність прямих взаємозв’язків між CEACAM1 та Кі-67, натомість не було виявлено участі молекул клітинної адгезії у чутливості нормальної та пухлинної тканини ендометрію до естрогену та прогестерону. Основні закономірності коливання CEACAM1 у тканині матки відповідають характеристикам молочної залози з

усіма особливостями антигенного спрощення та ускладнення протягом прогресування злоякісного процесу.

Підсумовуючи вищесказане, ми пропонуємо наступні твердження про оцінку та прогностичне значення CEACAM1 у тканинах пухлини молочної залози та матки. I. Оцінювання CEACAM1 повинно проводитися виключно дослідниками без використання автоматичних аналізаторів (комп'ютерних програм); інакше наявність позитивно забарвлених структур (лейкоцитів, судин, нормальних і не злоякісних тканин молочної залози) може призвести до помилково позитивних висновків. II. Пригнічення експресії CEACAM1 є показником злоякісності в молочній залозі та матці. III. Забарвлену CEACAM1 тканину слід вважати злоякісною лише в тому випадку, якщо CEACAM1 експресується цитоплазмою та цілою мембраною неопластичних клітин. Її верхівкове вираження повинно бути диференційоване з нормальними та гіперпластичними (не злоякісними) структурами. IV. Використання таких термінів, як "збільшення CEACAM1" та "зниження CEACAM1" є неприпустимим для РМЗ та матки. З одного боку, їх кількість слід порівнювати з нормальними тканинами молочної залози та ендометрію, яка зазвичай є позитивною. З іншого боку, частина випадків пухлин має неоднорідне вираження CEACAM1 (позитивні та негативні області в тому самому випадку). Слід приділяти більше уваги схемі вираження CEACAM1, ніж їх присутності в оцінюваному випадку. V. Хоча взаємозв'язків між p53, VEGF, E-кадгерином, ER, PR та CEACAM1 не знайдено, вони мають міцний зв’язок із варіацією агресивності пухлини. Їх інгібуючий вплив на проліферативну активність (експресія Ki-67) дозволяє стверджувати про антагоністичні властивості CEACAM1 під час прогресування пухлини. Отже, їх наявність у неоплазії (незалежно від клітинної частини, де вони експресуються) слід вважати прогностично сприятливою ознакою пухлин порівняно з негативними випадками CEACAM.

ВИСНОВКИ

1. Пухлинна трансформація у молочній залозі супроводжується варіабельністю експресії CEACAM1 – зникненням з поверхні неопластичних клітин, дислокацією у цитоплазму та експресією по всій поверхні клітин. Основні закономірності цього процесу відповідають антигенній атипії клітин – антигенному спрощенню та антигенному ускладненню. Це обов'язково необхідно враховувати при оцінці імунопрофілю неопластичних клітин.

2. Детальний аналіз експресії CEACAM1 у неопластичній тканині матки та молочної залози дозволив встановити їх інгібуючий вплив на проліферативну активність карцином. У міру зникнення та дислокації CEACAM1 відбувається наростання інтенсивності поділу пухлинних клітин.

3. Незважаючи на повідомлення про участь CEACAM1 у регуляції апоптозу, чутливості до естрогену, прогестерону та їх вплив на ангіогенний потенціал тканин, ми не виявили взаємозв'язку між експресією молекул клітинної адгезії раково-ембріонального антигену та p53, VEGF, ER, PR. Також результати наших досліджень демонструють відсутність їх участі у адгезивних властивостях нормальної та пухлинної тканини.

4. Основою мінерального компоненту простатолітів є кальцію фосфат у формі гідроксиапатиту, основним компонентом corpora amylacea є амілоїд.

5. Присутність інтралюмінальних включень у тканині РПЗ супроводжується активацією апоптотичних процесів та зниженням інтенсивності ангіогенезу. Зміни експресії імуногістологічних маркерів у пухлинних клітинах РПЗ не залежать від природи інтралюмінальних включень.

ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ

1. Godinjak Z, Bilalovic N. Estrogen and progesterone receptors in endometrium in women with unexplained infertility. Mater Sociomed. 2014 Feb;26(1):51-2.

2. Sherman ME. Theories of endometrial carcinogenesis: a multidisciplinary approach. Mod Pathol. 2000 Mar;13(3):295-308.

3. Jamison PM, Noone AM, Ries LA, Lee NC, Edwards BK. Trends in endometrial cancer incidence by race and histology with a correction for the prevalence of hysterectomy, SEER 1992 to 2008. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2013 Feb;22(2):233-41.

4. Bokhman JV. Two pathogenetic types of endometrialcarcinoma. Gynecol Oncol. 1983; 15:10–7.

5. Setiawan VW, Yang HP, Pike MC, McCann SE, et all. Type I and II endometrial cancers: have they different risk factors? J Clin Oncol. 2013 Jul 10;31(20):2607-18.

6. Shen F, Gao Y, Ding J, Chen Q. Is the positivity of estrogen receptor or progesterone receptor different between type 1 and type 2 endometrial cancer? Oncotarget. 2017 Jan 3;8(1):506-511.

7. Srijaipracharoen S, Tangjitgamol S, Tanvanich S, Manusirivithaya S, Khunnarong J, Thavaramara T, Leelahakorn S, Pataradool K. Expression of ER, PR, and Her-2/neu in endometrial cancer: a clinicopathological study. Asian Pac J Cancer Prev. 2010;11(1):215-20.

8. Singer BB, Lucka L. CEACAM1. UCSD-nature molecule pages. 2005.

9. Obrink B. CEA adhesion molecules: multifunctional proteins with signal-regulatory properties. Curr Opin Cell Biol. 1997 Oct;9(5):616-26.

10. Beauchemin N, Arabzadeh A. Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules (CEACAMs) in cancer progression and metastasis. Cancer Metastasis Rev. 2013 Dec;32(3-4):643-71.

11. Hammarström S. The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. Semin Cancer Biol. 1999 Apr;9(2):67-81.

12. Kuespert K, Pils S, Hauck CR. CEACAMs: their role in physiology and pathophysiology. Curr Opin Cell Biol. 2006 Oct;18(5):565-71.

13. Bamberger AM, Riethdorf L, Nollau P, Naumann M, Erdmann I, Götze J, Brümmer J, Schulte HM, Wagener C, Löning T. Dysregulated expression of CD66a (BGP, C-CAM), an adhesion molecule of the CEA family, in endometrial cancer. Am J Pathol. 1998 Jun;152(6):1401-6.

14. Briese J, Schulte HM, Bamberger CM, Löning T, Bamberger AM. Expression pattern of osteopontin in endometrial carcinoma: correlation with expression of the adhesion molecule CEACAM1. Int J Gynecol Pathol. 2006 Apr;25(2):161-9.

15. Islam EA, Anipindi VC, Francis I, Shaik-Dasthagirisaheb Y, Xu S, Leung N, Sintsova A, Amin M, Kaushic C, Wetzler LM, Gray-Owen SD. Specific Binding to Differentially Expressed Human Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecules Determines the Outcome of Neisseria gonorrhoeae Infections along the Female Reproductive Tract. Infect Immun. 2018 Jul 23;86(8). pii: e00092-18.

16. Horne AW, White JO, Lalani el-N. Adhesion molecules and the normal endometrium. BJOG. 2002 Jun;109(6):610-7.

17. Bamberger AM, Kappes H, Methner C, Rieck G, Brümmer J, Wagener C, Löning T, Milde-Langosch K. Expression of the adhesion molecule CEACAM1 (CD66a, BGP, C-CAM) in breast cancer is associated with the expression of the tumor-suppressor genes Rb, Rb2, and p27. Virchows Arch. 2002 Feb;440(2):139-144.

18. Yang C, He P, Liu Y, He Y, Yang C, Du Y, Zhou M, Wang W, Zhang G, Wu M, Gao F. Assay of serum CEACAM1 as a potential biomarker for breast cancer. Clin Chim Acta. 2015 Oct 23;450:277-81.

19. Wang JL, Sun SZ, Qu X, Liu WJ, Wang YY, Lv CX, Sun JZ, Ma R. Clinicopathological significance of CEACAM1 gene expression in breast cancer. Chin J Physiol. 2011 Oct 31;54(5):332-8.

20. Yang C, Cao M, Liu Y, He Y, Yang C, Du Y, Wang W, Zhang G, Wu M, Zhou M, Gao F. Inhibition of cell invasion and migration by CEACAM1-4S in breast cancer. Oncol Lett. 2017 Oct;14(4):4758-4766.

21. Sappino AP, Buser R, Seguin Q, Fernet M, Lesne L, Gumy-Pause F, Reith W, Favaudon V, Mandriota SJ. The CEACAM1 tumor suppressor is an ATM and p53-regulated gene required for the induction of cellular senescence by DNA damage. Oncogenesis. 2012 Apr 16;1:e7.

22. Singer BB, Scheffrahn I, Obrink B. The tumor growth-inhibiting cell adhesion molecule CEACAM1 (C-CAM) is differently expressed in proliferating and quiescent epithelial cells and regulates cell proliferation. Cancer Res. 2000 Mar 1;60(5):1236-44.

23. Singer BB, Scheffrahn I, Kammerer R, Suttorp N, Ergun S, Slevogt H. Deregulation of the CEACAM expression pattern causes undifferentiated cell growth in human lung adenocarcinoma cells. PLoS One. 2010 Jan 18;5(1):e8747.

24. Poy MN, Ruch RJ, Fernstrom MA, Okabayashi Y, Najjar SM. Shc and CEACAM1 interact to regulate the mitogenic action of insulin. J Biol Chem. 2002 Jan 11;277(2):1076-84.

25. Abou-Rjaily GA, Lee SJ, May D, Al-Share QY, Deangelis AM, Ruch RJ, Neumaier M, Kalthoff H, Lin SH, Najjar SM. CEACAM1 modulates epidermal growth factor receptor--mediated cell proliferation. J Clin Invest. 2004 Oct;114(7):944-52.

26. Obrink B. CEA adhesion molecules: multifunctional proteins with signal-regulatory properties. Curr Opin Cell Biol. 1997 Oct;9(5):616-26.

27 Wegwitz F, Lenfert E, Gerstel D, von Ehrenstein L, Einhoff J, Schmidt G, Logsdon M, Brandner J, Tiegs G, Beauchemin N, Wagener C, Deppert W, Horst AK. CEACAM1 controls the EMT switch in murine mammary carcinoma in vitro and in vivo. Oncotarget. 2016 Sep 27;7(39):63730-63746.

28. Yang C, Cao M, Liu Y, He Y, Yang C, Du Y, Wang W, Zhang G, Wu M, Zhou M, Gao F. Inhibition of cell invasion and migration by CEACAM1-4S in breast cancer. Oncol Lett. 2017 Oct;14(4):4758-4766.

29. Riethdorf L, Lisboa BW, Henkel U, Naumann M, Wagener C, Löning T. Differential expression of CD66a (BGP), a cell adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family, in benign, premalignant, and malignant lesions of the human mammary gland. J Histochem Cytochem. 1997 Jul;45(7):957-63.

30. Lenfert E, Maenz C, Heinlein C, Jannasch K, Schumacher U, Pantel K, Tolstonog GV, Deppert W, Wegwitz F. Mutant p53 promotes epithelial-mesenchymal plasticity and enhances metastasis in mammary carcinomas of WAP-T mice. Int J Cancer. 2015 Mar 15;136(6):E521-33.

31. Leung N, Turbide C, Olson M, Marcus V, Jothy S, Beauchemin N. Deletion of the carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (Ceacam1) gene contributes to colon tumor progression in a murine model of carcinogenesis. Oncogene. 2006 Sep 7;25(40):5527-36.

32. Kirshner J, Chen CJ, Liu P, Huang J, Shively JE. CEACAM1-4S, a cell-cell adhesion molecule, mediates apoptosis and reverts mammary carcinoma cells to a normal morphogenic phenotype in a 3D culture. Proc Natl Acad Sci USA. 2003;100:521–526.

33. Sappino AP, Buser R, Seguin Q, Fernet M, Lesne L, Gumy-Pause F, Reith W, Favaudon V, Mandriota SJ. The CEACAM1 tumor suppressor is an ATM and p53-regulated gene required for the induction of cellular senescence by DNA damage. Oncogenesis. 2012 Apr 16;1:e7.

34. Singer BB, Klaile E, Scheffrahn I, Müller MM, Kammerer R, Reutter W, Obrink B, Lucka L. CEACAM1 (CD66a) mediates delay of spontaneous and Fas ligand-induced apoptosis in granulocytes. Eur J Immunol. 2005 Jun;35(6):1949-59.

35. Yu Q, Chow EM, Wong H, Gu J, Mandelboim O, Gray-Owen SD, Ostrowski MA. CEACAM1 (CD66a) promotes human monocyte survival via a

phosphatidylinositol 3-kinase- and AKT-dependent pathway. J Biol Chem. 2006 Dec 22;281(51):39179-93.

36. Li Y, Shively JE. CEACAM1 regulates Fas-mediated apoptosis in Jurkat T-cells via its interaction with β-catenin. Exp Cell Res. 2013 May 1;319(8):1061-72.

37. Lobo EO, Zhang Z, Shively JE. Pivotal advance: CEACAM1 is a negative coreceptor for the B cell receptor and promotes CD19-mediated adhesion of B cells in a PI3K-dependent manner. J Leukoc Biol. 2009 Aug;86(2):205-18.

38. Ergün S, Kilik N, Ziegeler G, Hansen A, Nollau P, Götze J, Wurmbach JH, Horst A, Weil J, Fernando M, Wagener C. CEA-related cell adhesion molecule 1: a potent angiogenic factor and a major effector of vascular endothelial growth factor. Mol Cell. 2000 Feb;5(2):311-20.

39. Wagener C, Ergün S. Angiogenic properties of the carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1. Exp Cell Res. 2000 Nov 25;261(1):19-24.

40. Guo JQ, Yu WH, Wang HJ, Liu B, Zhu KX, Zhang QH, Zhang TG, Xu WH, Wang HB, Wu HL, Zhou CJ. Different expression patterns of CEACAM1 and its impacts on angiogenesis in gastric nonneoplastic and neoplastic lesions. Ann Surg Oncol. 2012 Jul;19 Suppl 3:S365-74.

41. Zhou CJ, Qu X, Yang YM, Wang FF, Dong ZQ, Wang CQ, Zhang XY, Liu GX, Wei FC, Sun SZ. CEACAM1 distribution and it's effects on angiogenesis and lymphangiogenesis in oral carcinoma. Oral Oncol. 2009 Oct;45(10):883-6.

42. Tilki D, Irmak S, Oliveira-Ferrer L, Hauschild J, Miethe K, Atakaya H, Hammerer P et al. CEA-related cell adhesion molecule-1 is involved in angiogenic switch in prostate cancer. Oncogene. 2006;25:4965–4974.

43. Rueckschloss U, Kuerten S, Ergün S. The role of CEA-related cell adhesion molecule-1 (CEACAM1) in vascular homeostasis. Histochem Cell Biol. 2016;146(6):657-671.

44. Gerstel D, Wegwitz F, Jannasch K, Ludewig P, Scheike K, Alves F, Beauchemin N, Deppert W, Wagener C, Horst AK. CEACAM1 creates a pro-

angiogenic tumor microenvironment that supports tumor vessel maturation. Oncogene. 2011 Oct 13;30(41):4275-88.

45Pernar, C.H., Ebot, E.M., Wilson, K.M., Mucci, L.A. (2018). The Epidemiology of Prostate Cancer. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 8(12), a030361 doi: 10.1101/cshperspect.a030361.

46. Bray F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., Jemal A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. Cancer journal for clinicians, 68 (6), 394-424 doi: 10.3322/caac.21492.

47. Романюк, А.М., Москаленко, Р.А., Піддубний, А.М., Сікора В.В. (2016). Аналіз захворюваності на злоякісні пухлини передміхурової залози в Сумській області. Вісник проблем біології і медицини, 2 (1), 94-97.

48. Romaniuk, A.M., Moskalenko, R.A., Piddubnyi, A.M., Sikora, V.V. (2016). Analiz zakhvoryuvanosti na zloyakisni puchlyny peredmichurovoi zalozy v Sumskiy oblasti [Analysis of the incidence of malignant tumors of the prostate in Sumy region]. Visnyk problem biologii i medycyny – Bulletin of Biology and Medicine, 2 (1), 94-97.

49. Roberts, R.O., Bergstralh, E., Bass, S.E., Lieber, M.M., Jacobsen, S.J. (2004). Prostatitis as a Risk Factor for Prostate Cancer. Epidemiology, 15(1), 93-99, doi: 10.1097/01.ede.0000101022.38330.7c.

50. Stark, T., Livas, L., Kyprianou, N. (2015). Inflammation in prostate cancer progression and therapeutic targeting. Translational Andrology and Urology, 4(4), 455-463 doi: 10.3978/j.issn.2223-4683.2015.04.12.