

DOI 10.29254/2077-4214-2019-4-1-153-246-254

УДК 616.61 – 006.6 – 018.1 – 092.18

Потапов С. М., Галата Д. І., Плітень О. М., Сидоренко Р. В., Андрєєв А. В.

СТАН ЕКСТРАЦЕЛЮЛЯРНОГО МАТРИКСУ І МІЖКЛІТИННОЇ АДГЕЗІЇ

В ЕМБРІОНАЛЬНОМУ РАКУ ЯЄЧКА

Харківський національний медичний університет (м. Харків)

pathomorphologist@gmail.com

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами. Дослідження проведено в рамках науково-дослідної роботи «Вивчення значення молекулярно-біологічних маркерів для прогнозу, лікування і виживання хворих з основними локалізаціями раку» (№ державної реєстрації 0114U003394).

Вступ. За даними Національного інституту раку в Україні у чоловіків вікової групи 18-29 років питома вага пухлини яєчок (ПЯ) складає 29,7%. І хоча даний вид неоплазії відноситься до рідкісних новоутворень [1], він є найбільш частою онкологічною патологією і основною причиною онкологічної смертності чоловіків молодого віку, що надає даній проблемі велике медичне і соціальне значення [2].

Серед ПЯ найчастіше зустрічаються герміногенні пухлини яєчка (ГПЯ), на частку яких за даними літератури припадає понад 90% всіх неоплазій даної локалізації [3,4].

Після семіноми ембріональний рак (ЕР) є найбільш поширеною ГПЯ і хоча тільки 2,3-16% випадків представлені «чистими» варіантами ЕР, дана пухлина зустрічається в 40% всіх ГПЯ і в 87% несеміномних пухлин [5].

Діагностика пухлин, а також оцінка можливого прогнозу захворювання є важливим завданням сучасної онкоморфології. В даний час активно вивчаються ті чи інші молекулярно-біологічні характеристики пухлин, але використання будь-якого одного біологічного маркера не може забезпечити оцінки ризиків подальшого прогресування і рецидиву захворювання. Тому вибір адекватної панелі імуногістохімічних (ІГХ) маркерів є актуальним завданням.

Відомо, що специфічні матриксні металопротеїнази (ММП) гіперекспресують у багатьох злоякісних новоутвореннях, а такі характеристики пухлин, як низький рівень диференціювання, висока інвазійна і метастатична активність корелюють з підвищенням експресії багатьох ММП, як в первинних пухлинах, так і в метастазах [6-9].

Маркерами несприятливого прогнозу злоякісних новоутворень, крім ММП, називають і молекули міжклітинної адгезії – E-cadherin і β -catenin [10,11].

В клінічній практиці значимість E-cadherin підтверджена даними про зникнення мембранного розташування даного маркера, яке корелює зі збільшенням інвазійності пухлин і частоти метастазування, а також зі скороченням виживання після радикального хірургічного лікування первинних пухлин [12] і, таким чином, може служити критерієм прогнозу захворювання [13].

β -catenin – міжклітинний багатofункціональний білок, який бере участь у формуванні міцних міжклітинних контактів, в організації цитоскелету і, таким

чином, є центральним регуляторним компонентом адгезивного комплексу [14].

За даними Т. Brabletz (2001), ядерний β -catenin активує цілий ряд молекул, таких як ММП, активатор плазміногену урокіназного типу, ламінін, що сприяють значному посиленню інвазії і дисемінації ракових клітин [15].

Також було показано, що зменшення мембранної експресії E-cadherin і β -catenin, або аномальна експресія будь-якого з компонентів кадгерин-катенінового комплексу пов'язана з посиленням інвазійного потенціалу пухлини, збільшенням стадії захворювання і скороченням загальної виживаності [10,16,17].

В той же час аналіз наукових літературних джерел щодо значення ММП-1, ММП-3, ММП-9, ТІМР-1, E-cadherin і β -catenin в пухлинній прогресії ГПЯ слабо висвітлені як в зарубіжній, так і у вітчизняній літературі.

Мета дослідження – встановити особливості стану екстрацелюлярного матриксу (ЕЦМ) і міжклітинної адгезії в ЕР яєчка.

Об'єкт і методи дослідження. Дослідження виконано на матеріалі 13 спостережень ЕР яєчка (в тому числі 7 випадків, де ЕР був складовою змішаною ГПЯ), а також історій хвороби пацієнтів, що проходили обстеження і лікування на базі Харківського обласного клінічного центру урології і нефрології ім. В.І. Шаповала з 1998 по 2017 рр.

Всі спостереження ЕР були розподілені за типом гістологічної будови відповідно до класифікації ВООЗ і патологічної рТNM класифікації [5], що є вкрай важливим, тому що точне встановлення діагнозу і стадіювання у відповідності до сучасних уявлень є фундаментальними [18].

Так, керуючись рТNM класифікацією, за ступенем пухлинної прогресії були сформовані наступні групи:

1. Група «1», при якій пухлина була обмежена яєчком і його придатком, без інвазії в кровеносні або лімфатичні судини; при цьому пухлина могла вросати в білкову, але не у вагінальну оболонку, а метастази у регіонарні лімфатичні вузли і віддалені метастази були відсутні; сироваткові пухлинні маркери мали різні значення. Пухлини даної групи відповідали стадіям $T_1N_0S_{0-2}$.

2. Група «2», при якій пухлина була обмежена яєчком і його придатком з інвазією в кровеносні або лімфатичні судини, або пухлина проникала через білкову оболонку з ураженням вагінальної оболонки; при цьому були наявні метастази різного ступеня у регіонарні лімфатичні вузли, проте віддалені метастази були відсутні; сироваткові пухлинні маркери мали різні значення. Пухлини даної групи відповідали стадіям $T_2N_{1-3}S_{0-2}$.

3. Група «4» характеризувалась наявністю у пацієнта віддалених метастазів. При цьому метастази у регіонарні лімфатичні вузли могли бути відсутні; сироваткові пухлинні маркери мали різні значення. Пухлини даної групи відповідали стадіям T₂₋₃N₀₋₃S₀₋₂.

Матеріал для ІГХ дослідження фіксували в 10% нейтральному формаліні протягом 24 год, заливали в парафін, готували зрізи товщиною 4×10⁻⁶ м, які наносили на високоадгезивні скельця «SUPER FROST PLUS» фірми «DAKO» (Данія) і висушували при температурі 37°C протягом 18 годин. Демаскування було виконано методом кип'ятіння зрізів у цитратному буфері (pH 6,0). Для візуалізації первинних антитіл була застосована система детекції Ultra Vision Quanto Detection Systems HRP Polymer («Thermo Fisher Scientific Inc.», США). В якості хромогена використовували DAB (діамінобензидин). Зрізи дозобарвлювали гематоксиліном Майєра і заключали в канадський бальзам. Для кожного маркера з метою виключення хибнопозитивних або помилкових результатів були застосовані контрольні дослідження, в яких використовували зрізи з тканин, що рекомендовані виробником антитіл для позитивного контролю. Крім того, кожне дослідження мало негативний контроль без додавання первинних антитіл.

Для оцінки стану ЕЦМ і міжклітинної адгезії в EP досліджували експресію наступних ІГХ маркерів: MMP-1, MMP-3 і MMP-9 разом з їх тканинним інгібітором TIMP-1, а також E-cadherin і β-catenin. Панель використаних при ІГХ дослідженні первинних антитіл представлена в таблиці 1.

Таблиця 1 – Панель первинних антитіл

№	Первинне антитіло	Клон	Виробник
	Rb a-Hu MMP1 Polyclonal Antibody		«Thermo Fisher Scientific Inc.», США
	Rb a-Hu MMP3 Polyclonal Antibody		«Thermo Fisher Scientific Inc.», США
	Rb a-Hu MMP9 (92kDa Collagenase IV) Polyclonal Antibody		«Thermo Fisher Scientific Inc.», США
	Mo a-Hu TIMP1 Monoclonal Antibody	102D1	«Thermo Fisher Scientific Inc.», США
	Rb a-Hu E-cadherin Monoclonal Antibody	EP700Y	«Thermo Fisher Scientific Inc.», США
	Rb a-Hu beta Catenin Monoclonal Antibody	E247	«Thermo Fisher Scientific Inc.», США

Для реалізації якісного та об'єктивного аналізу цифрових зображень була розроблена методика, яка дозволила з максимальною ефективністю проводити обробку зображень і отримувати більш точні та інформативні кількісні дані і, тим самим, поліпшити якість інтерпретації отриманих результатів (Патент України на винахід № 119922) [19].

ІГХ забарвлені гістологічні зрізи досліджуваних тканин реєстрували за допомогою мікроскопу Olympus BX-41TF (Японія) і цифрової фотокамери Olympus C3040-ADU (Японія). Отримані фотографії обробляли у програмному пакеті Matlab, використовуючи стандартні інструменти обробки цифрових зображень. Для морфометричного вимірювання відносної площі (S), яку займають імунопозитивні структури, у виділеній області автоматично обчислювалось співвідношення кількості пікселів цифрового зображення області імунопозитивної реакції до загальної кількості пікселів в зображенні, визначене

у %. За значеннями яскравості кольорних RGB каналів у кожному пікселі вихідного зображення розраховували допоміжні кольорні координати CIE XYZ, а потім – кольорні координати CIE Lab. Таким чином, вихідному цифровому зображенню відповідав тримірний масив кольорних координат CIE Lab, однією з яких є світлість (L), значення котрої можуть коливатись у межах від 0 до 100. При цьому L=0-40 відповідає сильному рівню інтенсивності експресії маркера, L=40-50 – середньому, L=50-100 – слабкому.

S та L експресії маркерів вивчалась у 30 випадково обраних полях зору мікроскопа Olympus BX-41TF при збільшенні ×200 (3,12×10⁻⁷ м²) у кожному спостереженні.

Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою пакету статистичного аналізу тріал-версії STATISTICA 13.3 EN. Для порівняння центральних тенденцій в групах використовували непараметричний критерій Манна-Уїтні [20,21], оскільки обсяг вибірки в групах не перевищував 5 спостережень. Однак, описові статистики представлені традиційно як середнє ± похибка середнього (M±m), оскільки для вибірки з 4-5 спостережень важко визначити медіану і квартилі. Всі статистичні гіпотези, в тому числі про значимість відмінностей центральних тенденцій в групах, перевірялися при довірчій ймовірності 95% (p<0,05). Для оцінки зв'язків між показниками використовували непараметричний коефіцієнт кореляції Спірмена [20].

Результати досліджень та їх обговорення. Кількісні дані експресії ІГХ маркерів, що відображають стан ЕЦМ і міжклітинної адгезії в EP, представлені в таблиці 2.

Дослідження MMP-1 в групі «1» виявило слабку L цитоплазматичної експресії і невисоку S імунопозитивного забарвлення вказаного маркера. Розподіл імунопозитивних клітин був нерівномірним. В групі «2» відмічалось достовірне збільшення S експресії MMP-1, а L забарвлення даного маркера залишалась слабкою (рис. 1, А) і не відрізнялась від такої в попередній групі. Що стосується групи «4», то S експресії MMP-1 майже повністю співпадала з такою в групі «2» і також була більше відповідного показника в групі «1». Рівень L експресії MMP-1 відповідав помірному і був найбільшим серед досліджуваних груп. Звертало увагу посилення експресії даного маркера в зонах інвазії, як в кровоносні, так і лімфатичні судини (рис. 1, Б).

При вивченні експресії маркера MMP-3 в спостереженнях EP групи «1» було встановлено, що його цитоплазматична експресія характеризувалась рівномірністю розподілу. При цьому, середня S експресії MMP-3 була досить значною, а L, хоча в середньому і була помірною, але наближалась до слабого рівня. В групі «2» MMP-3-імунопозитивні клітини або їх групи також були рівномірно розподілені як в центральних, так і периферичних ділянках пухлин (рис. 1, В, Г). Середня S експресії MMP-3 та L забарвлення вказаного маркера були достовірно вищими за відповідні показники попередньої групи. В групі «4» показник середньої S експресії MMP-3 майже не відрізнявся від аналогічного в групі «2» і був достовірно вище за такий в групі «1». Щодо L експресії MMP-3, то в групі «4» вона достовірно не відрізнялась від значень двох попередніх груп і також відповідала помір-

Таблиця 2 – Показники стану ЕЦМ і міжклітинної адгезії в ЕР

Показники	Група «1» (n ₁ =5)	Група «2» (n ₂ =4)	Група «4» (n ₄ =4)	p
MMP-1, S, %	3,34±0,34	8,14±0,1	8,19±0,71	p ₁₂ =0,014 p ₁₄ =0,014 p ₂₄ >0,05
MMP-1, L, од.	57,01±1,46	55,27±0,1	49,6±0,57	p ₁₂ >0,05 p ₁₄ =0,014 p ₂₄ =0,021
MMP-3, S, %	9,39±1,81	15,01±0,16	15,21±0,42	p ₁₂ =0,014 p ₁₄ =0,014 p ₂₄ >0,05
MMP-3, L, од.	49,77±0,46	47,79±0,4	49,01±0,36	p ₁₂ =0,027 p ₁₄ >0,05 p ₂₄ >0,05
MMP-9, S, %	24,42±1,8	27,96±0,35	32,35±0,8	p ₁₂ =0,014 p ₁₄ =0,014 p ₂₄ =0,021
MMP-9, L, од.	39,11±0,31	39,02±0,21	38,54±0,22	p ₁₂ >0,05 p ₁₄ >0,05 p ₂₄ >0,05
TIMP-1, S, %	-	-	-	-
TIMP-1, L, од.	-	-	-	-
E-cadherin, S, %	3,92±0,71	-	1,22±1,22	p ₁₄ =0,032
E-cadherin, L, од.	47,95±2,39	-	-	-
β-catenin, S, %	4,33±0,08	8,6±1,03	10,08±2,95	p ₁₂ =0,014 p ₁₄ =0,05 p ₂₄ =0,05
β-catenin, L, од.	54,59±0,57	44,2±2,43	49,22±4,35	p ₁₂ =0,014 p ₁₄ >0,05 p ₂₄ >0,05

ному рівню. В зонах ангіоінвазії (як у самій судинній стінці, так і периваскулярно) відмічалось посилення експресії ферменту MMP-3.

Цитоплазматична експресія маркера MMP-9 в спостереженнях ЕР групи «1» в цілому була рівномірною. Середня S імунопозитивних ділянок була значною, при цьому, L експресії MMP-9 була сильною. В групі «2» розподіл ферменту MMP-9 в пухлині також був рівномірним. Середня S експресії маркера в зазначеній групі достовірно перевищувала аналогічний показник в групі «1», а рівень L експресії MMP-9 також був сильним і не відрізнявся від відповідного значення попередньої групи (рис. 2, А). В групі «4» середня S MMP-9-імунопозитивного забарвлення була найбільшою серед досліджуваних груп, а L експресії – сильною і не відрізнялась від такої в попередніх групах. Рівень експресії ферменту MMP-9 був дещо посилений в зонах ангіоінвазії та дисоціації пухлинних клітин (рис. 2, Б).

Звертало на себе увагу те, що в усіх групах ЕР S експресії MMP-9 перевищувала S експресії MMP-3, яка, в свою чергу, була вищою за S експресії MMP-1.

Таким чином, в нашій роботі при вивченні MMP-1, MMP-3 і MMP-9 в усіх групах дослідження ЕР були виявлені однотипні зміни, а саме посилення синтезу вказаних маркерів по мірі зростання стадії пухлинної прогресії, що дозволяє припустити значну роль MMP в руйнуванні ЕЦМ, інвазії та, як слідство, лімфо- і гематогенному метастазуванні [22].

З проведеного дослідження також очевидно, що MMP-1, MMP-3 і, особливо, MMP-9 приймають участь в канцерогенезі ЕР вже на ранніх стадіях пухлинної прогресії. При цьому, виразна експресія MMP в ЕР говорить про схильність до більш агресивного перебігу даної пухлини, оскільки відомо, що MMP залучені до широкого спектру ролей, які можуть сприяти ініціації, росту, міграції, ангіогенезу, селекції апоптоз-резистентних субпопуляцій, а також інвазії та метастазування [23]. З урахуванням викладених вище даних можна вважати вказані маркери прогностично значущими.

Наявність негативної реакції з TIMP-1 в ЕР усіх досліджених груп співпадає з даними літератури, які свідчать, що підвищення експресії MMP супроводжується зниженням експресії TIMP [24].

Маркери міжклітинної адгезії E-cadherin і β-catenin дозволяють вивчати стан клітинних контактів, ослаблення яких визначають початок і подальший розвиток метастазування.

Середня S, зайнята E-cadherin-імунопозитивними клітинами в ЕР групи «1» була невисокою, а L експресії даного маркера – помірною. ІГХ реакція виявила нерівномірне, осередкове забарвлення пухлинної тканини: більш інтенсивне в епітеліальному компоненті і слабке – в стромальному. Характерним було цитоплазматичне і, подекуди, ядерне розташування E-cadherin, а мембранна локалізація маркера зустрічалась вкрай рідко. Особливо яскраво це було виражено в ділянках дисоціації пухлинних клітин.

Між спостереженнями даної групи були відмінності, а саме – в одному з п'яти випадків S експресії E-cadherin (6,71±0,11%) була значно більшою середнього значення по групі та достовірно вищою за аналогічний показник в кожному окремому спостереженні (p<0,01). Не дивлячись на в цілому помірний рівень експресії E-cadherin, зустрічалися поля слабого забарвлення і невеликі пухлинні комплекси E-cadherin-негативних клітин (рис. 2, В).

В двох з чотирьох спостережень групи «2» експресія E-cadherin була вкрай слабою за інтенсивністю і визначалась лише в одиничних клітинах ЕР, що було особливо виражено в ділянках дисоціації пухлинних клітин. В інших двох випадках ІГХ реакція з E-cadherin була негативною (рис. 2, Г).

Вивчення експресії E-cadherin в групі «4», яка була представлена чотирьома випадками, виявило, що в трьох із них реакція була негативною, а в одному – розподіл E-cadherin був нетиповим. В даному спостереженні визначались два типи комплексів пухлинних клітин: в перших – експресія E-cadherin була відсутня, а в других – локалізація даного маркера була вкрай гетерогенною, що проявлялось як мембранною (подекуди з осередками її руйнування) і цитоплазматичною, так і ядерною локалізацією з невеликими локусами гіперекспресії E-cadherin (рис. 3, А). В цьому випадку середня S експресії маркера складала 4,86±0,93%, а L була сильною – 39,84±0,38 од.

При дослідженні β-catenin в групі «1» встановлено, що середня S експресії даного маркера була

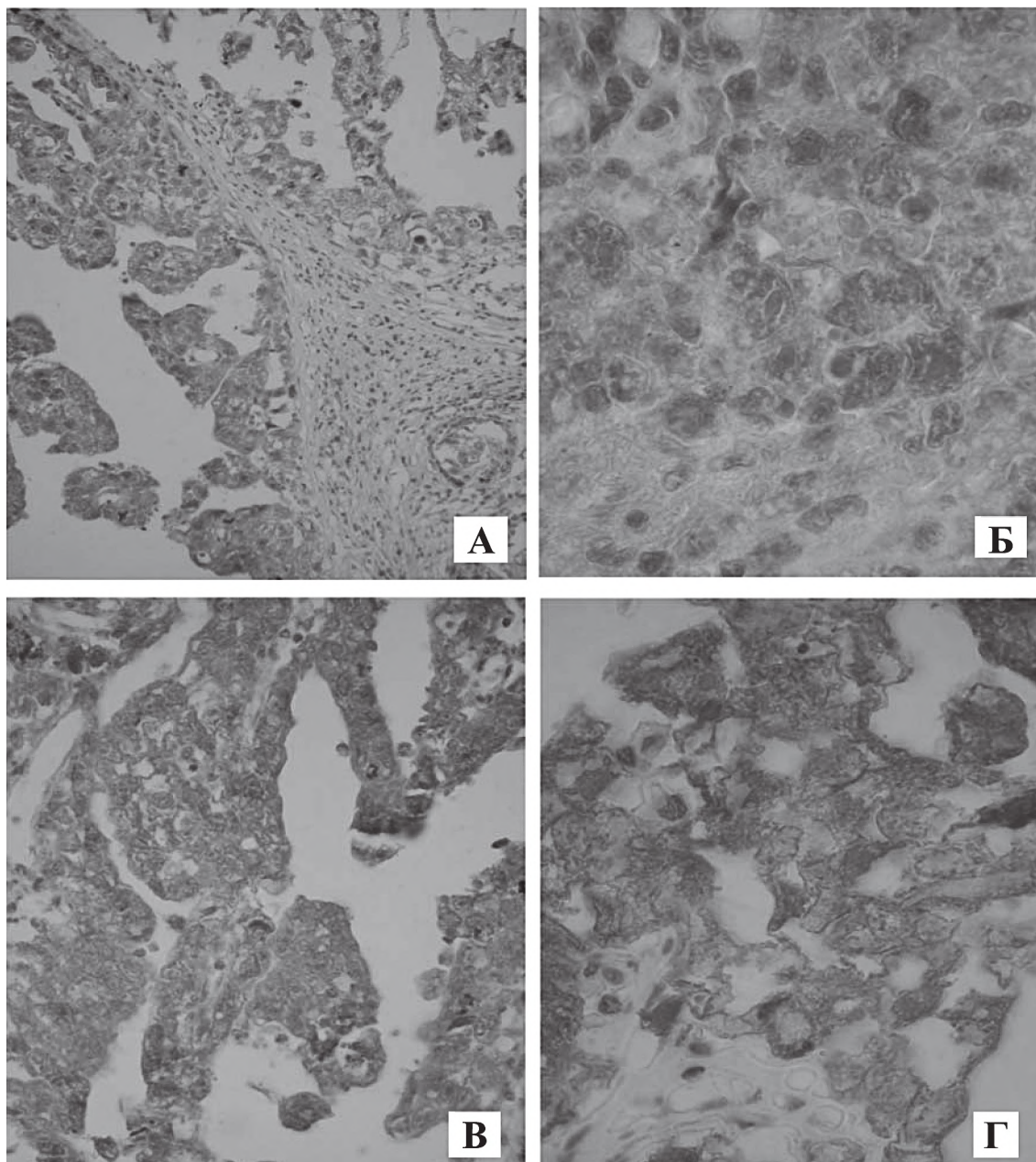


Рисунок 1 – А. Слабка реакція з MMP-1 в клітинах EP групи «2» ($\times 200$). Б. Помірною реакцією з MMP-1 (зона ангіогенезу) в клітинах EP групи «4» ($\times 1000$). В. Помірною реакцією з MMP-3 в EP групи «2» ($\times 400$). Г. Помірною реакцією з MMP-3 в осередку вираженої дисоціації пухлинних клітин EP групи «2» ($\times 1000$). ІГХ метод, додаткове забарвлення гематоксилином Майєра.

невеликою, а L – слабкою. При цьому, розподіл β -catenin був різномірним: в невеликій частині імунопозитивних клітин зберігалась суто мембранна експресія маркера, але в більшості полів зору вона була мембранно-цитоплазматичною. В осередках дисоціації пухлинних клітин мембранна експресія β -catenin була вкрай слабкою або зовсім втрачалась (рис. 3, Б).

В групі «2» S експресії β -catenin була більшою у порівнянні з такою в групі «1», як і L, яка також збільшувалась до рівня помірної. Розподіл імунопозитивних клітин був доволі рівномірним, маркер в них мав переважно цитоплазматичну локалізацію, при цьому, в окремих ділянках забарвлення було не гомогенним, а зернистим. Мембранне розташування маркера виявлялось лише в поодиноких пухлинних клітинах і мало характер переривистого і слабого за L забарвлення. Внаслідок втрати міжклітинної адгезії

спостерігалась виражена дисоціація пухлинних клітин (рис. 3, В).

S експресії β -catenin в групі «4» була більшою у порівнянні з відповідним значенням в групах «1» і «2», а L залишалась на помірному рівні і не відрізнялась від значень груп «1» і «2». Розподіл β -catenin в різних випадках даної групи мав відмінності: в трьох з чотирьох спостережень експресія β -catenin була подібною і мала мембранно-цитоплазматичну або суто цитоплазматичну локалізацію з помірною інтенсивністю (рис. 3, Г), а в окремих пухлинних клітинах відмічалась повна редукція даного маркера. В одному випадку групи «4» S ($1,62 \pm 0,21\%$) та L експресії ($62,28 \pm 0,17$ од.) β -catenin значно зменшувались ($p < 0,01$) в порівнянні з відповідними показниками трьох вище описаних випадків. В цьому спостереженні, як і при дослідженні E-cadherin, визначались

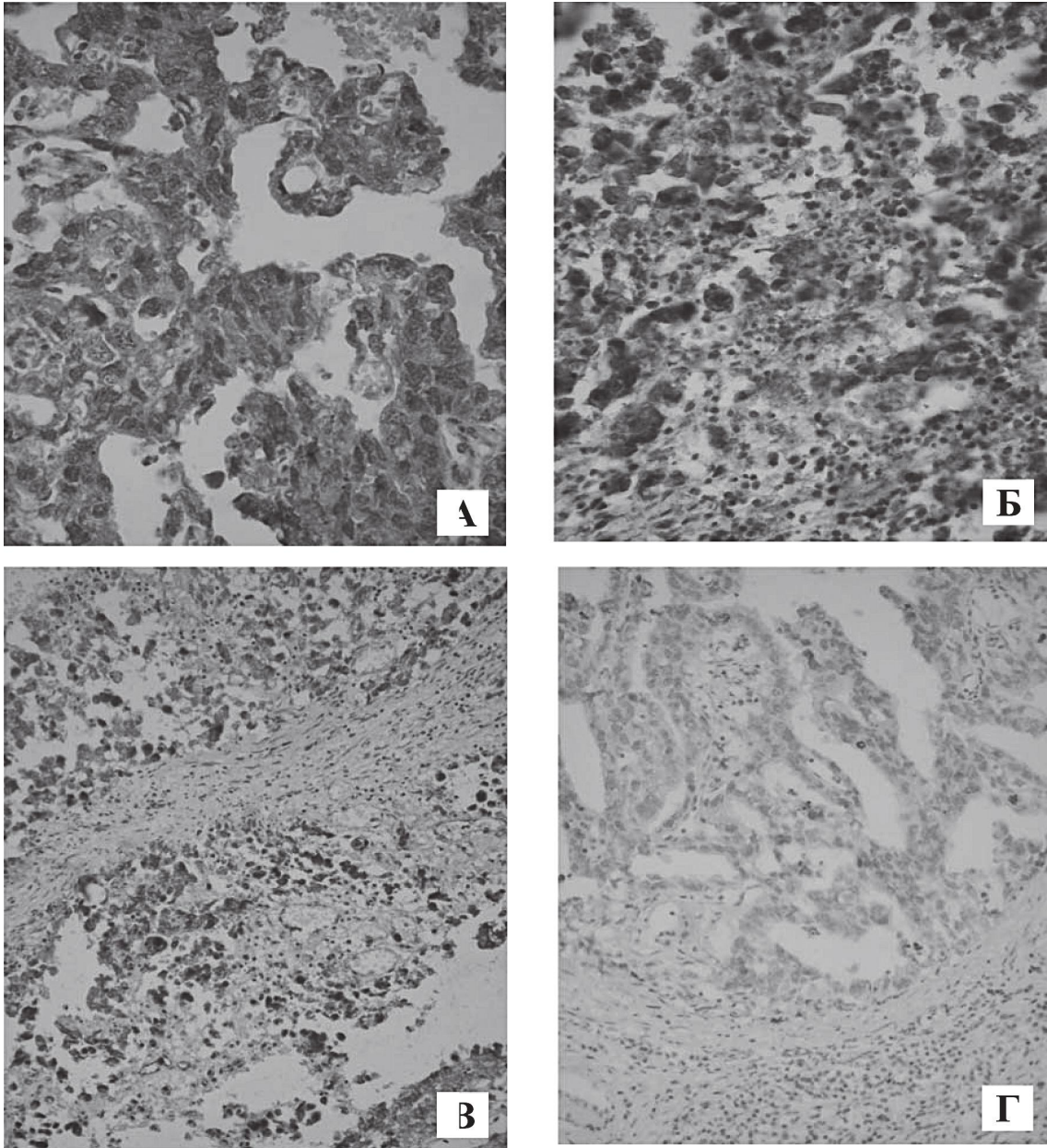


Рисунок 2 – А. Цитоплазматична експресія MMP-9 сильної інтенсивності в EP групи «2» (×400). Б. Цитоплазматична експресія MMP-9 сильної інтенсивності в осередку вираженої дисоціації пухлинних клітин EP групи «4» (×400). В. Помірна цитоплазматично-ядерна експресія E-cadherin в EP групи «1» (×200). Г. Негативна реакція з E-cadherin в ембріональному раку групи «2» (×200). ІГХ метод, додаткове забарвлення гематоксином Майєра.

два типи розподілу маркера: осередки з повною відсутністю імунопозитивного забарвлення, а також ділянки, в яких зберігалась переважно мембранна локалізація β -catenin, хоча і з осередками переривистості або редукції.

Аналіз S експресії E-cadherin в EP виявив, що вказаний показник в початкових стадіях пухлинної прогресії (група «1») був достовірно вищим за такий в більш пізніх стадіях ($p < 0,05$). При цьому, вже у групі «2» S експресії E-cadherin не могла бути підрахована за рахунок її незначності (в 50% спостережень вона була негативною і ще в 50% випадків визначалась лише в поодиноких пухлинних клітинах). А в групі «4», хоча і було отримано середньогрупове значення S експресії E-cadherin, в 75% спостережень ІГХ реакція була негативною. Що стосується L експресії

E-cadherin в EP, то вона могла бути підрахована лише в групі «1» і одному спостереженні групи «4», що унеможливило порівняльний міжгруповий аналіз даного показника.

Що стосується β -catenin, то в EP S його експресії, при переході від початкових до більш пізніх стадій пухлинної прогресії прогресивно збільшувалась, при цьому, між всіма дослідженими групами були виявлені достовірні відмінності у вказаному показнику ($p < 0,05$). L експресії β -catenin в EP зі слабого рівня в групі «1» змінювалась на помірний в групах «2» і «4».

Таким чином, можна прийти до висновку, що в EP S експресії E-cadherin зменшувалась, а β -catenin, навпаки, збільшувалась по мірі зростання стадії пухлинної прогресії. Згідно з літературними даними пригнічення активності або повна інактивація

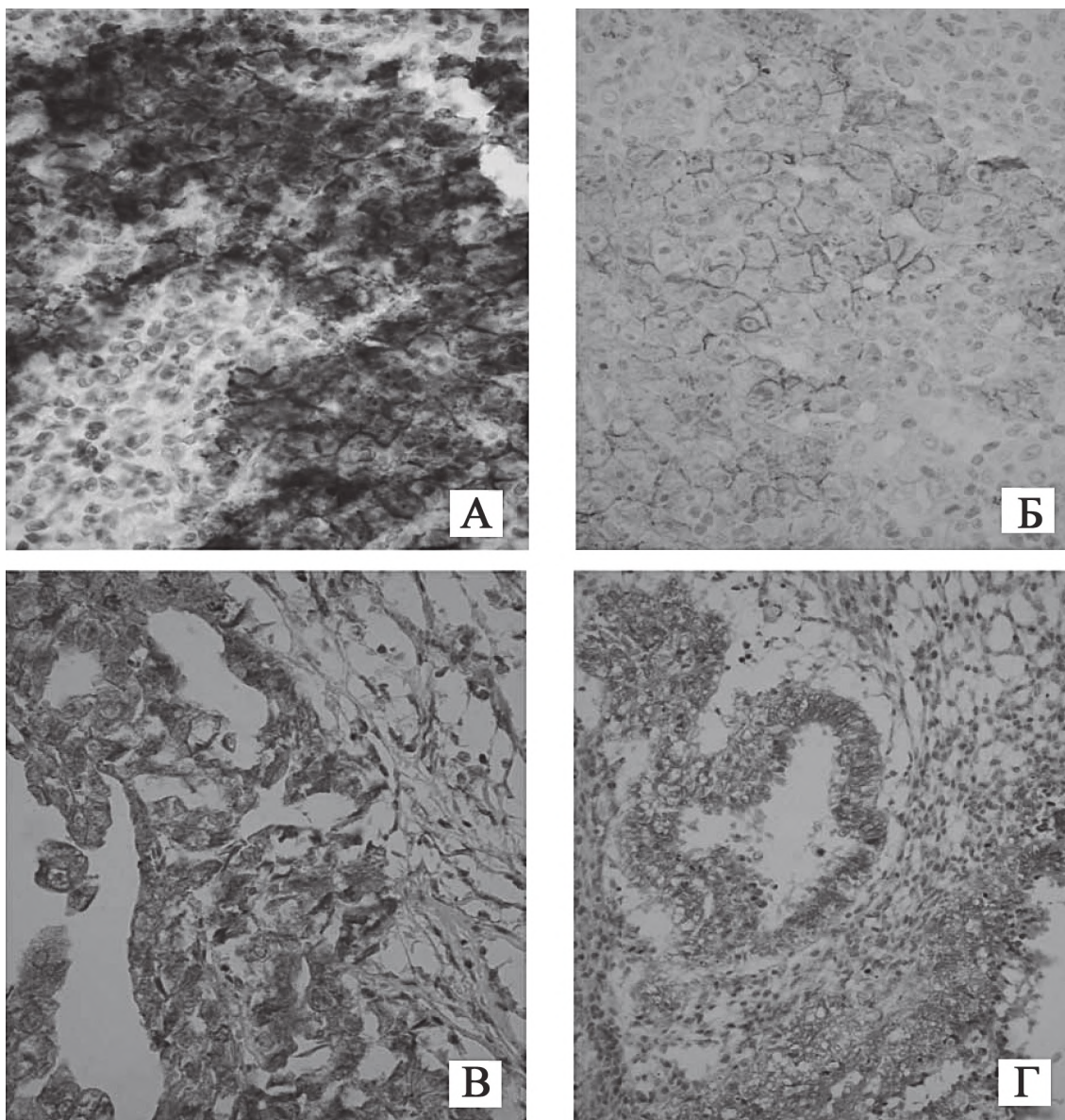


Рисунок 3 – А. Локус пухлинних клітин з гіперекспресією і гетерогенним розподілом E-cadherin: мембранна (подекуди з осередками її руйнування), цитоплазматична і ядерна локалізація в ЕР групи «4» (×400). Б. Слабка мембранна експресія β-catenin з осередками її повної втрати в ЕР групи «1» (×400). В. Помірна, переважно цитоплазматична експресія β-catenin в дисоційованих пухлинних клітинах ЕР групи «2» (×400). Г. Помірна, переважно цитоплазматична експресія β-catenin в ЕР групи «4» (×200). ІГХ метод, додаткове забарвлення гематоксином Майєра.

E-cadherin доводять ключову роль даного маркера, як супресора інвазії та метастазування [25]. На думку інших авторів агресивний і метастатичний характер неоплазій різних локалізацій обумовлений не тільки відсутністю або редукцією E-cadherin, а ще й поєднанням цих змін зі збільшенням експресії β-catenin [26]. Підвищена експресія β-catenin була виявлена в більшості первинних пухлин товстої кишки, при цьому, високий рівень експресії β-catenin достовірно корелював з внутрішньосудинною інвазією і наявністю метастазів [27].

Вважається, що при позитивній ІГХ реакції, крім кількісної оцінки S і L експресії маркерів E-cadherin і β-catenin, доцільно враховувати наявність замість «типового» мембранного забарвлення, так званих, «гетерогенностей», що представлені змішаними ділянками імунонегативних та імунопозитивних клітин, як з мембранним забарвленням, так і з цитоплазматичним і/або ядерним, при яких воно є

«нетиповим» і трактується як втрата міжклітинної адгезії [11,28].

В ЕР починаючи вже з групи «1» переважала цитоплазматична локалізація E-cadherin та β-catenin і мало місце навіть ядерне розташування вказаних маркерів, а мембранне – майже не виявлялось. При переході до більш пізніх стадій пухлинної прогресії (групи «2» і «4»), окрім описаних «гетерогенностей» в експресії E-cadherin і β-catenin, виявлялась втрата зв'язку між пухлинними клітинами у вигляді їх дисоціації та втрата зв'язку пухлинних клітин з ЕЦМ.

Таким чином, при вивченні експресії E-cadherin і β-catenin необхідно звертати увагу як на втрату інтенсивного мембранного забарвлення, так і на появу, особливо в місцях пухлинної інвазії, «гетерогенностей», оскільки саме нетипове розташування E-cadherin і β-catenin значно більшою мірою визначають втрату міжклітинної адгезії і набуття пухлиною інвазійного та метастатичного потенціалу, ніж визна-

Таблиця 3 – Взаємозв'язки показників ІГХ маркерів

Коефіцієнт кореляції Спірмена					
S експресії, %					
ІГХ маркери	MMP-1	MMP-3	MMP-9	E-cadherin	β-catenin
MMP-1	1,00	0,89	0,84	-0,47	0,42
MMP-3	0,89	1,00	0,84	-0,55	0,46
MMP-9	0,84	0,84	1,00	-0,55	0,58
E-cadherin	-0,47	-0,55	-0,55	1,00	-0,83
β-catenin	0,42	0,46	0,58	-0,83	1,00
L експресії, од.					
ІГХ маркери	MMP-1	MMP-3	MMP-9	E-cadherin	β-catenin
MMP-1	1,00	0,18	0,29	0,37	0,24
MMP-3	0,18	1,00	0,16	0,34	0,43
MMP-9	0,29	0,16	1,00	0,56	0,29
E-cadherin	0,37	0,34	0,56	1,00	0,78
β-catenin	0,24	0,43	0,29	0,78	1,00

Таблиця 4 – Зв'язок показників ІГХ маркерів з агресивністю EP

U критерій Манна-Уїтні											
		MMP-1, S, %	MMP-1, L, од.	MMP-3, S, %	MMP-3, L, од.	MMP-9, S, %	MMP-9, L, од.	E-cadherin, S, %	E-cadherin, L, од.	β-catenin, S, %	β-catenin, L, од.
Віддалені метастази	«+»	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	«-»	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
	p	>0,05	0,01	>0,05	>0,05	0,01	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
Лімфогенні метастази	«+»	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
	«-»	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	p	0,003	>0,05	0,01	0,02	0,02	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	0,05
Судинна інвазія	«+»	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	«-»	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	p	0,003	0,02	0,003	0,04	0,003	>0,05	0,02	>0,05	0,03	0,03

чення показників S та L ІГХ забарвлення. Такий погляд на експресію E-cadherin і β-catenin розділяють і інші автори [11,28].

При оцінці показників експресії досліджених ІГХ маркерів з використанням непараметричного коефіцієнта кореляції Спірмена було встановлено, що по мірі зростання стадії пухлинної прогресії спостерігалися достовірні високі позитивні зв'язки між S експресії MMP-1, MMP-3 і MMP-9 (p<0,05). Також звертало на себе увагу наявність достовірного помірного зв'язку між S експресії MMP-9 і S експресії β-catenin при збільшенні стадії пухлинної прогресії (p<0,05). Встановлено наявність високого зворотного зв'язку між S експресії E-cadherin і β-catenin при переході від початкових до пізніх стадій пухлинної прогресії (p<0,05). Також було виявлено наявність помірного і високого позитивних зв'язків між L експресії E-cadherin та L експресії β-catenin і MMP-9 по мірі зростання стадії пухлинної прогресії (p<0,05) (**таблиця 3**).

Таким чином, кореляційний аналіз в поєднанні з наведеними вище даними продемонстрував два

взаємопов'язаних процеси: деградації ВКМ і втрати клітинної адгезії, які посилювалися по мірі зростання пухлинної прогресії, що сприяло дисоціації пухлинних клітин і, як наслідок, інвазії і метастазуванню.

Також було встановлено, що у пацієнтів з наявністю судинної інвазії показники S і L експресії всіх досліджених маркерів, за винятком L MMP-9 і E-cadherin, були достовірно більшими, ніж у пацієнтів без неї. Крім цього, при порівнянні показників ІГХ дослідження пацієнтів з лімфогенними метастазами і пацієнтів без метастатичного ураження лімфатичних вузлів було встановлено, що S експресії MMP-1, MMP-3 і MMP-9, а також L експресії MMP-3 і β-catenin були достовірно меншими у останніх. Порівняння показників експресії досліджуваних маркерів у пацієнтів з віддаленими метастазами виявив, що лише S експресії MMP-9 та L експресії MMP-1 були достовірно більшими, ніж у пацієнтів без віддалених метастазів (**таблиця 4**).

Наведене доводить, що розвиток клініко-морфологічних ознак агресивного характеру EP, таких як судинна інвазія і розвиток метастатичної хвороби опосередковані збільшенням показників експе-

сії маркерів стану ЕЦМ (MMP-1, MMP-3 і MMP-9), а також змінами в експресії маркерів міжклітинної адгезії (E-cadherin і β-catenin).

Висновки. В EP при переході від початкових до більш пізніх стадій пухлинної прогресії, для яких характерний агресивний характер перебігу, відзначено достовірне збільшення показників S і L експресії MMP, а також повна відсутність експресії TIMP-1.

При прогресуванні EP відбувається зниження S експресії E-cadherin аж до повної його редукції і, навпаки, збільшення S експресії β-catenin в поєднанні з атиповою локалізацією даних маркерів (цитоплазматична і/або ядерна), що відображає втрату міжклітинної адгезії.

Показники експресії MMP, їх інгібітора TIMP-1, а також E-cadherin і β-catenin можуть бути незалежними факторами прогнозу метастазування і прогресії EP.

Перспективи подальших досліджень. Планується дослідження стану ЕЦМ і міжклітинної адгезії, а також процесів васкуляризації в ГПЯ.

Література

1. Burova EA, Bulanov AA, Tryakin AA, Fedyanin MYu, Tyulyandin SA, Matveev VB. Lechenie seminomy yaichka i stadii. *Onkourologiya*. 2010;3:7-11. [in Russian].
2. Imyaninov EN. Epidemiologiya i biologiya germinogennykh opukholey. *Prakticheskaya onkologiya*. 2006;7(1):1-5. [in Russian].
3. Nemtsova MV, Ivkin EV, Tryakin AA, Rudenko VV, Dantsev IS, Tyulyandin SA, et al. Geneticheskiye faktory riska razvitiya sporadicheskikh germinogennykh opukholey yaichka. *Urologiya*. 2017;1:24-30. [in Russian].
4. Mustafa SA, Mitla V, Banday SZ, Kuchay S. Profile of Testicular Germ Cell Tumors in Kashmir: A Retrospective Analysis. *International J. of Scientific Study*. 2017;5(4):183-6.
5. Moch H, Humphrey PA, Ulbright TM, Reuter VE, editors. *WHO Classification of Tumors of the Urinary System and Male Genital Organs* (4th edition). Lyon: IARC; 2016. 356 p.
6. Escaff S, Fernández JM, González LO, Suárez A, González-Reyes S, González JM, et al. Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in prostate cancer. *Br J Cancer*. 2010 Mar 2;102(5):922-9. DOI: 10.1038/sj.bjc.6605569
7. Rogova LN, Shesternina NV, Zamechnik TV, Fastova IA. Matriksnyye metalloproteinazy, ikh rol v fiziologicheskikh i patologicheskikh protsessakh (obzor). *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy*. 2011;18(2):86-9. [in Russian].
8. Kushlinskiy NE, Gershteyn ES. Matriksnyye metalloproteinazy i komponenty sistemy aktivatsii plazminogena v patogeneze i klinicheskoy techenii raka tolstoy kishki. *Patogenez*. 2013;11(3):4-12. [in Russian].
9. Avdoshin VP, Babichenko II, Kotelnikova EV. Prognosticheskoye znacheniye ekspressii immunogistokhimicheskikh markerov Ki-67. MMP-9 i kollagena IV u bolnykh papillyarnym urotelialnym rakom mochevogo puzrya. *Onkourologiya*. 2011;3:75-9. [in Russian].
10. Ozgüven BY, Karaçetin D, Kabukçuoğlu F, Taşkın T, Yener Ş. Immunohistochemical study of E-cadherin and β -catenin expression in colorectal carcinomas. *Pol J Pathol*. 2011;62(1):19-24.
11. Shponka IS, Kovtunenkov OV, Poslavskaya OV, Bereznyuk DV, Timchuk SM. Analiz markeriv mizhklitinnoi adgezii u khvorikh na ploskoklitinnyi rak orofaringealnoi dilyanki. *Bukovinskiy medichnyi visnik*. 2012;16(1):104-9. [in Ukrainian].
12. Filiz AI, Senol Z, Sucullu I, Kurt Y, Demirbas S, Akin ML. The survival effect of E-cadherin and catenins in colorectal carcinomas. *Colorectal Dis*. 2010 Dec;12(12):1223-30. DOI: 10.1111/j.1463-1318.2009.01994.x
13. Onder TT, Gupta PB, Mani SA, Yang J, Lander ES, Weinberg RA. Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Res*. 2008 May 15;68(10):3645-54. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2938
14. Brabletz T, Jung A, Dargatzis A, Reu S, Kirchner T. [beta-Catenin induces invasive growth by activating matrix metalloproteinases in colorectal carcinoma]. *Verh Dtsch Ges Pathol*. 2000;84:175-81.
15. Brabletz T, Jung A, Reu S, Porzner M, Hlubek F, Kunz-Schughart LA, et al. Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001 Aug 28;98(18):10356-61.
16. Matsuoka T, Mitomi H, Fukui N, Kanazawa H, Saito T, Hayashi T, et al. Cluster analysis of claudin-1 and -4, E-cadherin, and β -catenin expression in colorectal cancers. *J Surg Oncol*. 2011 Jun 1;103(7):674-86. DOI: 10.1002/jso.21854
17. Wang L, Cheng H, Liu Y, Wang L, Yu W, Zhang G, et al. Prognostic value of nuclear β -catenin overexpression at invasive front in colorectal cancer for synchronous liver metastasis. *Ann Surg Oncol*. 2011 Jun;18(6):1553-9. DOI: 10.1245/s10434-010-1519-9
18. Lobo J, Costa AL, Vilela-Salgueiro B, Rodrigues Â, Guimarães R, Cantante M, et al. Testicular germ cell tumors: revisiting a series in light of the new WHO classification and AJCC staging systems, focusing on challenges for pathologists. *Hum Pathol*. 2018 Dec;82:113-24. DOI: 10.1016/j.humpath.2018.07.016
19. Potapov SM, Markovskiy VD, Kulishova NE, vynakhidnyky; Kharkivskiy natsionalnyi medychnyi universytet, patentovlasnyk. Sposib kilkisnoi otsinky rivnia svitlosti ta vidnosnoi ploshchi ekspresii markeriv pry imunohistokhimichnomu doslidzhenni tkanyn. Patent Ukrainy №119922. 2019 Serp 27. [in Ukrainian].
20. Kobzar AI. Prikladnaya matematicheskaya statistika. Dlya inzhenerov i nauchnykh rabotnikov [Internet]. Fizmatlit; 2012. 816 s. Dostupno: <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785922113755.html> [in Russian].
21. Runyon RP. *Nonparametric Statistics: A Contemporary Approach* (Addison-Wesley series in statistics). Addison-Wesley Publishing Co; 1977. 218 p.
22. Patel BP, Shah SV, Shukla SN, Shah PM, Patel PS. Clinical significance of MMP-2 and MMP-9 in patients with oral cancer. *Head Neck*. 2007 Jun;29(6):564-72.
23. Lynch CC, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases in tumor-host cell communication. *Differentiation*. 2002 Dec;70(9-10):561-73.
24. Andreyeva YuYu. Morfologicheskiye i molekulyarno-biologicheskiye faktory prognoza raka mochevogo puzrya [dissertatsiya]. Moskva: Moskovskiy nauchno-issledovatel'skiy onkologicheskii institut im. P.A. Gertsena Rosmedtekhologii; 2009. 64 s. [in Russian].
25. Bex G, van Roy F. Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009 Dec;1(6):a003129. DOI: 10.1101/cshperspect.a003129
26. Mashukov AA. Molekulyarno-geneticheskiye osobennosti raka zheludka: obzor. *Vestnik morskoy meditsiny*. 2016;4:161-9. [in Russian].
27. Perevoshchikov AG, Delektorskaya VV, Golovkov DA. Molekuly mezhkлетochnoy adgezii kak faktory invazii i metastazirovaniya pri rake tolstoy kishki. *Molekulyarnaya meditsina*. 2007;1:50-4. [in Russian].
28. Pyo SW, Hashimoto M, Kim YS, Kim CH, Lee SH, Johnson KR, et al. Expression of E-cadherin, P-cadherin and N-cadherin in oral squamous cell carcinoma: correlation with the clinicopathologic features and patient outcome. *J Craniomaxillofac Surg*. 2007 Jan;35(1):1-9.

СТАН ЕКСТРАЦЕЛЮЛЯРНОГО МАТРИКСУ І МІЖКЛІТИННОЇ АДГЕЗІЇ В ЕМБРІОНАЛЬНОМУ РАКУ ЯЄЧКА

Потапов С. М., Галата Д. І., Плітень О. М., Сидоренко Р. В., Андреев А. В.

Резюме. В статті викладені дані про стан екстрацелюлярного матриксу і міжклітинної адгезії в ембріональному раку яєчка. Показано, що при його прогресуванні збільшуються площа та інтенсивність експресії маркерів MMP-1, MMP-3 і MMP-9 при відсутності експресії TIMP-1, знижується площа експресії E-cadherin і збільшується площа експресії β -catenin в поєднанні з атиповою локалізацією даних маркерів. Вивчені маркери можуть бути незалежними факторами прогнозу метастазування і прогресії ембріонального раку яєчка.

Ключові слова: ембріональний рак яєчка, екстрацелюлярний матрикс, міжклітинна адгезія, імуногістохімічне дослідження.

СОСТОЯНИЕ ЭКСТРАЦЕЛЛЮЛЯРНОГО МАТРИКСА И МЕЖКЛЕТОЧНОЙ АДГЕЗИИ В ЭМБРИОНАЛЬНОМ РАКЕ ЯИЧКА

Потапов С. Н., Галата Д. И., Плитень О. Н., Сидоренко Р. В., Андреев А. В.

Резюме. В статье изложены данные о состоянии экстрацеллюлярного матрикса и межклеточной адгезии в эмбриональном раке яичка. Показано, что при его прогрессировании увеличиваются площадь и интенсив-

ність експресії маркерів MMP-1, MMP-3 і MMP-9 при відсутності експресії TIMP-1, знижується площа експресії E-cadherin і збільшується площа експресії β -catenin в поєднанні з атипичною локалізацією даних маркерів. Вивчені маркери можуть бути незалежними факторами прогнозу метастазування і прогресії ембріонального раку яичка.

Ключеві слова: ембріональний рак яичка, екстрацелюлярний матрикс, міжклітинна адгезія, імуногістохімічне дослідження.

STATE OF EXTRACELLULAR MATRIX AND CELL ADHESION IN TESTICULAR EMBRYONAL CARCINOMA

Potapov S. M., Halata D. I., Pliten O. M., Sidorenko R. V., Andreev A. V.

Abstract. Testicular tumors is the most common oncological pathology and the main cause of oncological mortality in young men. Testicular germ cell tumors (TGCT) account more than 90% of all neoplasia with this localization. After seminoma, embryonal carcinoma (EC) is the most common TGCT.

In recent years the molecular and biological properties of tumors have been actively studied to estimate the risks of further disease progression. Matrix metalloproteinases (MMP) and intercellular adhesion molecules E-cadherin and β -catenin are considered as markers of unfavorable prognosis of malignant neoplasms.

The purpose of study. To determine the state of extracellular matrix (ECM) and cell adhesion in testicular EC.

Object and methods. The study was performed on the material of 13 removed testicles affected by EC (including 7 cases when EC was a component of mixed TGCT) as well as medical histories of patients who have been examined and treated at the Kharkiv Regional Clinical Center of Urology and Nephrology named after V.I. Shapoval for the period covering 1998-2017.

According to the pathological pTNM classification, all observations of the EC were divided into: tumors of group «1» corresponded to stages $T_1N_0S_{0-2}$, group «2» – $T_2N_{1-3}S_{0-2}$, group «4» – $T_{2-3}N_{0-3}S_{0-2}$ with distant metastasis.

For studying of state of ECM and cell adhesion in EC expression of the following immunohistochemical markers were investigated: MMP-1, MMP-3 and MMP-9 with their tissue inhibitor TIMP-1 as well as E-cadherin and β -catenin. For the analysis of digital images was investigated technique that allowed to perform processing of images and receive accurate quantitative data of area (S) and intensity (L) of marker expression. Statistical data processing was performed using the statistical package «STATISTICA 13.3 EN trial version».

Results. The study of MMP-1, MMP-3, and MMP-9 in EC revealed an increase of these markers synthesis at tumorous progression. It was found that MMP-1, MMP-3 and especially MMP-9 are involved in the carcinogenesis of EC starting from early stages of tumorous progression. At that significant expression of MMP in the EC point to the tendency of this tumor to aggressive course.

S of E-cadherin expression was increasing and S of β -catenin on the contrary was decreasing during transition from the initial to the late stages of tumorous progression of EC. Besides, «heterogeneities» presented by foci of immunonegative and immunopositive cells with cytoplasmic and/or nuclear staining are indicating loss of intercellular adhesion.

Conclusion. In EC at transition from the initial to the late stages of tumorous progression a significant increasing of S and L of MMP expression, as well as a complete absence of TIMP-1 expression were detected. At the progression of EC there is a decrease of S of E-cadherin expression up to its complete reduction and, conversely, an increase of S of β -catenin expression in combination with atypical localization of these markers, reflecting the loss of intercellular adhesion. MMP, their inhibitor TIMP-1, as well as E-cadherin and β -catenin may be independent factors of prognosis of the metastasis and progression in patients with EC.

Key words: testicular embryonal carcinoma, extracellular matrix, intercellular adhesion, immunohistochemical investigation.

Рецензент – проф. Старченко І. І.
Стаття надійшла 04.10.2019 року

DOI 10.29254/2077-4214-2019-4-1-153-254-257

УДК 616.832-006-055.2

Совгіря С. М.

КЛІНІЧНИЙ ВИПАДОК ГЛІОБЛАСТОМИ У ЖІНКИ 36-ТИ РОКІВ

Українська медична стоматологічна академія (м. Полтава)

sovhyria@i.ua

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами. Робота виконана в рамках комплексної міжфакультетської науково-дослідної теми Української медичної стоматологічної академії «Закономірності морфогенезу органів, тканин та судинно-нервових утворів у нормі, при патології та під впливом зовнішніх чинників», державний реєстраційний № 0118U004457.

Вступ. Гліобластома є однією з найпоширеніших пухлин центральної нервової системи, що складає до

62% всіх астроцитарних пухлин [1], характеризується надзвичайним тканинним і клітинним поліморфізмом із ділянками судинної проліферації та некрозу, вираженим перитуморозним набряком.

Незважаючи на те, що гліобластома є найчастішою первинною пухлиною мозку (до 52% первинних пухлин мозку і до 20% усіх внутрішньочерепних пухлин), за даними Всесвітньої організації охорони здоров'я, на 100 тис. населення Європи і Північної Америки реєструється всього 3-4 випадки захворю-