

DOI: 10.26693/jmbs05.01.072

УДК 616.681–006.6–091.8:576.36

Потапов С. М., Галама Д. І., Плітень О. М.

ІМУНОГІСТОХІМІЧНА ОЦІНКА ПРОЛІФЕРАТИВНО–АПОПТОТИЧНИХ ПРОЦЕСІВ В ЕМБРІОНАЛЬНОМУ РАКУ ЯЄЧКА

Харківський національний медичний університет, Україна

pathomorphologist@gmail.com

Зростання захворюваності на герміногенні пухлини яєчка в поєднанні з переважно молодим віком пацієнтів надає даній проблемі медичну і соціальну значимість.

Мета дослідження – встановити особливості проліферативно–апоптотичних процесів в ембріональному раку яєчка.

Дослідження виконано на матеріалі 13 оперативно видалених яєчок, уражених ембріональним раком. Пухлини були розподілені за ступенем пухлинної прогресії згідно рTNM класифікації. Для оцінки проліферативно–апоптотичних процесів досліджували відносну площу (S) та інтенсивність (L) експресії Ki–67, Вах, bcl–2 і p53, а також розраховували індекс проліферації.

Визначено зростання середніх значень S, L експресії Ki–67 та індекс проліферації, а також встановлений дуже високий і високий позитивний кореляційні зв'язки між IP та S і L експресії Ki–67 ($r = +0,94$; $r = +0,83$; $p < 0,05$ відповідно) при переході від початкових до пізніх стадій пухлинної прогресії. S експресії Вах також зростала по мірі збільшення стадії пухлинної прогресії ембріонального раку, а L експресії залишалась слабкою незалежно від стадії. Встановлено високий позитивний кореляційний зв'язок між S експресії Вах та S експресії Ki–67 з індексом проліферації ($r = +0,84$; $r = +0,82$; $p < 0,05$ відповідно) по мірі зростання стадії пухлинної прогресії. У пацієнтів з віддаленими метастазами і метастазами в лімфатичних вузлах S експресії Вах була більшою за таку у хворих без метастазів. Активність bcl–2 в ембріональному раку була незначною і визначалась переважно в клітинах імунного інфільтрату. Виявлено дуже високий і високий негативний кореляційний зв'язок між S експресії bcl–2 та S експресії Ki–67 з індексом проліферації ($r = -0,92$; $r = -0,88$; $p < 0,05$ відповідно) по мірі зростання стадії пухлинної прогресії. Кореляційний аналіз виявив високий позитивний зв'язок між S експресії p53 і S експресії Вах і Ki–67 ($r = +0,82$; $r = +0,71$; $p < 0,05$ відповідно) по мірі зростання стадії пухлинної прогресії та помірний позитивний зв'язок між S

експресії p53 та індексом проліферації ($r = +0,69$; $p < 0,05$). У пацієнтів з лімфогенними метастазами S експресії p–53 була більшою за таку у хворих без метастазів.

Використання маркерів Ki–67, Вах, bcl–2 і p53 в діагностиці пухлин яєчок є доцільним, так як вони відображають злоякісний потенціал пухлини, та можуть бути використані, як прогностичні маркери.

Ключові слова: ембріональний рак, проліферація, апоптоз, імуногістохімія.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. 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. В останні десятиліття загальна захворюваність герміногенними пухлинами яєчка (ГПЯ) збільшилася у всьому світі [1, 2], а в регіонах, де вона традиційно була низькою, темпи її зростання наближаються до показників регіонів з високою захворюваністю [3]. В Україні захворюваність на ГПЯ у 2017 році становила 2,6, а у чоловіків віком від 25 до 44 років – 4,6 випадків на 100 тис. чоловічого населення, а в структурі онкологічної захворюваності чоловіків віком від 18 до 29 років дана нозологія знаходиться на 2–му місці за частотою [4], що надає даній проблемі як медичну, так і соціальну значимість. У зв'язку з вищесказаним, є необхідність у вивченні індивідуальних властивостей даних пухлин та їх біологічної агресивності.

Мета дослідження – встановити особливості апоптотично–проліферативних процесів в ембріональному раку (ЕР) яєчка.

Матеріал та методи дослідження. Роботу виконано на матеріалі 13 видалених в ході орхіфунктулектомії яєчок, уражених ЕР (в тому числі 7 спостережень, де ЕР був складовою змішаної ГПЯ), а також історій хвороби на базі Харківського обласного клінічного центру урології і нефрології ім. В.І. Шаповала. Робота була проведена відповідно до

вимог «Інструкції про проведення судово-медичної експертизи» (наказ МОЗ України №6 від 17.01.1995), відповідно до вимог і норм, типовим положенням з питань етики МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р.

Всі спостереження були розподілені згідно патологічної рTNM класифікації ВООЗ [5], що є вкрай важливим, оскільки точне стадіювання у відповідності до сучасних уявлень є фундаментальними [6].

Для найбільш наочного порівняння імуногістохімічних (ІГХ) характеристик спостереження EP були розділені за ступенем пухлинної прогресії.

Так, керуючись рTNM класифікацією, були сформовані наступні групи:

1. Група «1», при якій пухлина була обмежена яєчком і його придатком, без інвазії в кровоносні або лімфатичні судини; при цьому пухлина могла вrostати 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 кровоносні або лімфатичні судини, або пухлина проникла 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 $T_{2-3}N_{0-3}S_{0-2}$.

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 (рН 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 дозabarвлювали 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 проліферативно-апоптотичних процесів досліджували експресію Ki-67, Vax, Bcl-2 і p53 з використанням моноклональних антитіл Mo a-Hu Ki-67 Monoclonal Antibody, Clone MIB-1 («DAKO», Данія), Mo a-Hu Bcl-2 Monoclonal Antibody, Clone 100/D5 («Thermo Fisher Scientific Inc.», США), Mo a-Hu p53 Monoclonal Antibody Clone DO-7 («DAKO», Данія) та поліклональних антитіл Rb a-Hu Vax Polyclonal Antibody («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) [7].

ІГХ забарвлені гістологічні зрізи реєстрували за допомогою мікроскопу Olympus BX-41TF (Японія) і цифрової фотокамери Olympus C3040-ADU (Японія). Отримані фотографії обробляли у програмному пакеті Matlab. 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 колірних RGB каналів у кожному пікселі вихідного зображення розраховували допоміжні колірні координати CIE XYZ, а потім – колірні координати CIE Lab. Таким чином, вихідному цифровому зображенню відповідав тримірний масив колірних 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 вивчалися у 30 випадково обраних полях зору мікроскопа Olympus BX-41TF при збільшенні $\times 200$ ($3,12 \times 10^{-7}$ м²) в кожному спостереженні.

Проліферативна активність в EP була досліджена шляхом підрахунку відсотку імунопозитивно забарвлених клітин (з використанням моноклональних антитіл Mo a-Hu Ki-67, Clone MIB-1, «DAKO», Данія) в стандартизованому полі зору мікроскопа Olympus BX-41TF (Японія) на збільшенні $\times 400$ ($7,5 \times 10^{-8}$ м²) з визначенням індексу проліферації (ІП). У кожному спостереженні аналізували по 20 полів зору з використанням наступної формули:

Для порівняння центральних тенденцій в групах використовувався непараметричний критерій Манна-Уїтні [8, 9], тому що обсяг вибірки в групах був малим. Проте, описові статистики представлені традиційно як середнє \pm похибка середнього ($M \pm m$), тому що для вибірки з 3–4 зразків 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 використовувався непараметричний коефіцієнт кореляції Спірмена [8].

Результати дослідження та їх обговорення.

Всі числові показники проліферативно-апопто-тичних процесів в ЕР представлені в таблиці 1.

Таблиця 1 – Показники проліферативно-апопто-тичних процесів в ЕР

Показники	Група «1» (n ₁ =5)	Група «2» (n ₂ =4)	Група «4» (n ₄ =4)	p
Ki-67, S, %	1,06 \pm \pm 0,048	1,66 \pm \pm 0,07	2,03 \pm \pm 0,2	p ₁₂ =0,028 p ₁₄ =0,021 p ₂₄ >0,05
Ki-67, L, од.	43,71 \pm \pm 0,58	43,04 \pm \pm 0,04	38,69 \pm \pm 1,48	p ₁₂ >0,05 p ₁₄ =0,021 p ₂₄ =0,021
ІП, %	17,12 \pm \pm 0,72	23,98 \pm \pm 1,43	30,0 \pm \pm 1,77	p ₁₂ =0,021 p ₁₄ =0,021 p ₂₄ >0,05
Vax, S, %	–	0,36 \pm \pm 0,03	0,66 \pm \pm 0,04	p ₂₄ =0,021
Vax, L, од.	–	54,99 \pm \pm 0,14	53,7 \pm \pm 0,46	p ₂₄ =0,021
Vcl-2, S, %	0,54 \pm \pm 0,01	–	–	–
Vcl-2, L, од.	42,54 \pm \pm 0,85	–	–	–
p-53, S, %	–	–	0,3 \pm \pm 0,05	–
p-53, L, од.	–	–	35,12 \pm \pm 0,53	–

Одним з найбільш специфічних маркерів проліферації є антиген Ki-67, який визначається в ядрах клітин під час пізньої G₁-фази, S, G₂ і M, але не в G₀-фазі клітинного циклу [10, 11].

Також доведено, що ІП при різних локалізаціях пухлини служить незалежним прогностичним показником виникнення рецидиву, загальної та безрецидивної виживаності, а також передбачуваним чинником для визначення чутливості до хіміо- і променевої терапії [12].

В ЕР S експресії Ki-67 була незначною і характеризувалась розбіжностями, які залежали від стадії пухлинної прогресії. Так, в групі «1» S експресії

Ki-67 та ІП були найменшими серед досліджених груп. Експресія маркера визначалась як в ядрах пухлинних клітин, так і в клітинах імунного інфільтрату (рис. 1, А). В групі «2», у порівнянні з групою «1», відмічалось помірно достовірне зростання середньої S експресії Ki-67 та ІП без відмінностей в L, яка знаходилась на помірному рівні, та локалізації даного маркера (пухлинні клітини та імунний інфільтрат) (рис. 1, Б). В групі «4» S експресії Ki-67 та ІП також були достовірно більшими за такі в групі «1» і не відрізнялись від аналогічних показників групи «2». А L експресії Ki-67 в даній групі була сильною і достовірно більшою ніж в групах «1» і «2». Ki-67-позитивні клітини виявлялись або відносно рівномірно по всій площі пухлинної тканини, або нерівномірно в різних ділянках, з посиленням в осередках більш вираженої атипії та інвазії (рис. 1, В, Г).

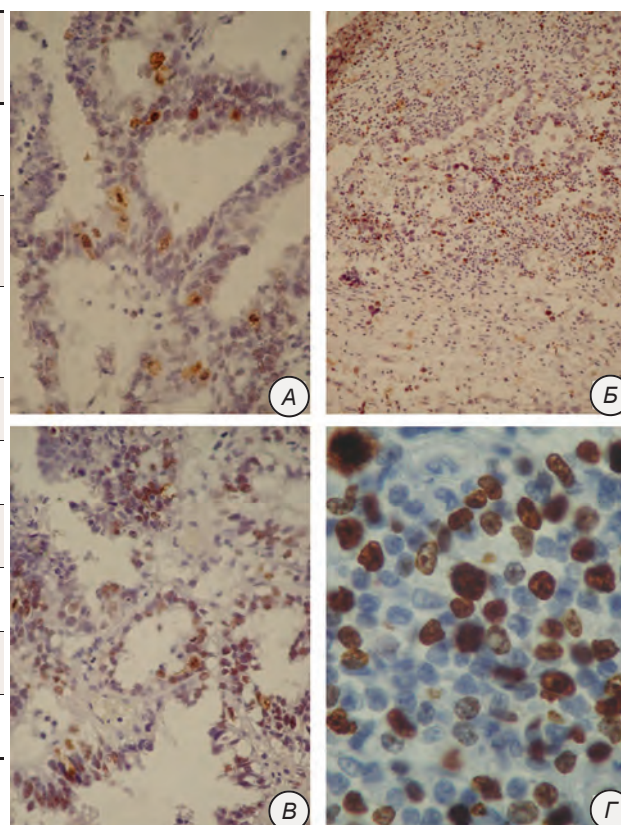


Рис. 1. А. Помірна інтрануклеарна реакція з Ki-67 в ЕР групи «1» (x400). Б. Помірна інтрануклеарна реакція з Ki-67 в пухлинних клітинах та імунному інфільтраті в ЕР групи «2» (x200). В. Інтенсивна інтрануклеарна реакція з Ki-67 в ЕР групи «4» (x400). Г. Інтенсивна інтрануклеарна реакція з Ki-67 в осередку інвазії в ЕР групи «4» (x1000). ІГХ метод, додаткове забарвлення гематоксиліном Майєра

Було встановлено, що по мірі зростання стадії пухлинної прогресії між ІП та S і L експресії Ki-67 спостерігався дуже високий і високий позитивний кореляційні зв'язки ($r = +0,94$; $r = +0,83$; $p < 0,05$)

відповідно), що підтверджує ефективність використання вказаної методики підрахунку S і L експресії Ki-67 при визначенні проліферативної активності.

Також звертав на себе увагу той факт, що у пацієнтів з віддаленими метастазами ІП та S і L експресії Ki-67 були достовірно вищими за аналогічні показники у пацієнтів без них. Аналогічна картина спостерігалась при наявності метастазів в лімфатичних вузлах (за виключенням L експресії Ki-67) (табл. 2). Це свідчить про значущість вказаних показників, як критеріїв злочисності.

Зростання S експресії маркера апоптоза Вах в ЕР також залежала від ступеня пухлинної прогресії. Так, в групі «1» в двох з п'яти випадків експресія даного маркера була відсутня, а, відповідно, в інших трьох спостереженнях відмічалась лише в цитоплазмі поодиноких пухлинних клітин. В групі «2» визначалась осередкова цитоплазматична реакція з Вах, при цьому, середня S експресії даного маркера була вкрай незначною, а його L – слабкою. В групі «4» середня S маркера апоптоза Вах, як і його L, були достовірно вищими за такі в групі «2». При цьому показники L експресії в усіх досліджених випадках групи «2» і «4» відповідали слабкому рівню.

При кореляційному аналізі було виявлено високий позитивний зв'язок між S експресії Вах та S експресії Ki-67 з ІП ($r = +0,84$; $r = +0,82$; $p < 0,05$ відповідно) по мірі зростання стадії пухлинної прогресії.

Також було виявлено, що у пацієнтів з віддаленими метастазами і метастазами в лімфатичних вузлах S експресії Вах була більшою за таку у хворих без метастазів (табл. 2).

Таким чином, апоптотичні процеси, як і проліферативна активність, зростали при переході від початкових до більш пізніх стадій пухлинної прогресії, але вони були вкрай незначними і проліферація превалювала над апоптозом. Між тим, в цілому, зростання проліферативно-апоптотичних процесів в ЕР були більш типовими при розвитку метастатичної хвороби.

Аналіз літератури свідчить, що в більшості ракових клітин проапоптотичний білок Вах є функціональним, але його активність значною мірою нейтралізується антиапоптотичними білками bcl-2, які часто надмірно експресують. Таким чином, активація Вах в пухлинних клітинах може бути ефективною терапевтичною стратегією [13]. Але в нашому дослідженні, як зазначено вище, експресія Вах була незначною, що теоретично доводить неефектив-

Таблиця 2 – Зв'язок показників ІГХ маркерів в ЕР з наявністю метастазів

	p	Віддалені метастази			p	Метастази в лімфатичних вузлах	
		«+»	«-»			«+»	«-»
Ki-67, S, %	0,02	9	4	Ki-67, S, %	0,03	5	7
Ki-67, L, од.	0,03	9	4	Ki-67, L, од.	>0,05	9	4
ІП, %	0,02	8	4	ІП, %	0,03	5	7
Вах, S, %	0,01	9	4	Вах, S, %	0,01	6	7
Вах, L, од.	>0,05	9	4	Вах, L, од.	>0,05	6	7
Bcl-2, S, %	>0,05	9	4	Bcl-2, S, %	0,01	4	7
Bcl-2, L, од.	>0,05	9	4	Bcl-2, L, од.	>0,05	4	7
p-53, S, %	>0,05	9	4	p-53, S, %	0,03	6	7
p-53, L, од.	>0,05	9	4	p-53, L, од.	>0,05	6	7

ність даного шляху лікування. Bcl-2 – антиапоптотичний білок мітохондріального шляху активації апоптоза, який локалізується в цитоплазмі і виступає як інгібітор росту пухлини [14].

У нашому дослідженні S експресії bcl-2 в групі «1» була незначною, а показник L знаходився на помірному рівні. При цьому, експресія даного маркера визначалась переважно в клітинах імунного інфільтрату, а в пухлинних клітинах зустрічалась зрідка. В групах «2» і «4» в половині спостережень реакція з bcl-2 була негативною, а в другій половині випадків – позитивною, але виявлялась лише в цитоплазмі поодиноких пухлинних клітин (подекуди з ядерною локалізацією даного маркера), а також значною мірою і в імунному інфільтраті (рис. 2, А).

При кореляційному аналізі було виявлено дуже високий і високий негативний зв'язок між S експресії bcl-2 та S експресії Ki-67 з ІП ($r = -0,92$; $r = -0,88$; $p < 0,05$ відповідно) по мірі зростання стадії пухлинної прогресії.

Також було виявлено, що у пацієнтів з лімфогенними метастазами S експресії bcl-2 була меншою за таку у хворих без метастазів, але, як вже було зазначено, оцінка даних параметрів стосувалась клітин імунного інфільтрату (табл. 2). Вищезазначене говорить про наявність інгібування апоптозу лише в початкових стадіях пухлинної прогресії, але це стосується клітин імунного інфільтрату.

Виходячи з отриманих даних стосовно експресії bcl-2, можна заключити, що даний маркер не є прогностично значущим в ЕР яєчка. Даний висновок співпадає з даними багатьох досліджень, в яких доведено, що bcl-2 в різних видах раку лише з обмеженим успіхом використовувався як незалежний прогностичний маркер [15–17].

Вважається, що мутації p53 можуть не тільки ініціювати канцерогенез, але й виникати в процесі

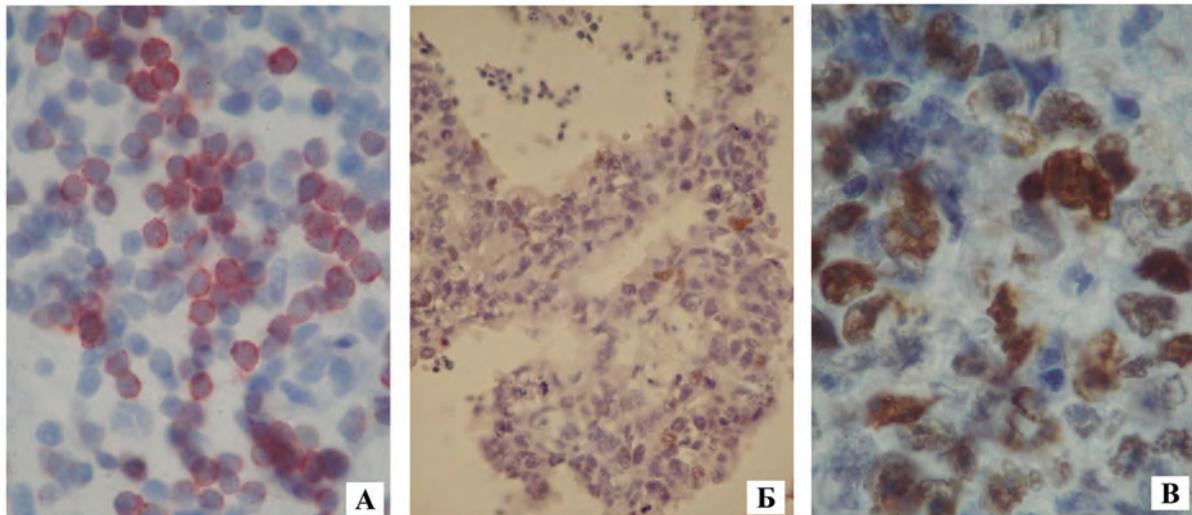


Рис. 2. А. Інтенсивна реакція з bcl-2 в імунному інфільтраті в ЕР групи «4» (×400). Б. Помірна інтрануклеарна реакція з p53-онкопротеїном в поодиноких клітинах ЕР групи «4» (×400). В. Інтенсивна інтрануклеарна реакція з p53-онкопротеїном в пухлинних клітинах ЕР групи «4» (×1000). ІГХ метод, додаткове забарвлення гематоксилином Майєра

росту неоплазії, що обумовлює її агресивні властивості. Мутантний p53 визначається в злоякісних новоутвореннях різних локалізацій [18, 19]. В той же час нам зустрілося лише одне повідомлення, що p53 в ГПЯ буває мутований рідко [20].

У нашій роботі експресія маркера p53 в групі «1» була виявлена в ядрах поодиноких пухлинних клітин в одному з п'яти спостережень, в інших чотирьох – реакція була негативною. А в групі «2» маркер p53 був знайдений в ядрах поодиноких пухлинних клітин в трьох з чотирьох спостережень. В групі «4» лише в одному з чотирьох спостережень позитивна реакція відмічалась в поодиноких пухлинних клітинах (рис. 2, Б), а в трьох, відповідно, позитивна реакція була більш виразною і могла бути підрахована; при цьому L експресії маркера була високою (рис. 2, В).

При кореляційному аналізі було виявлено високий позитивний зв'язок між S експресії p53 і S експресії Вах і Ki-67 ($r = +0,82$; $r = +0,71$; $p < 0,05$ відповідно) по мірі зростання стадії пухлинної прогресії. Також виявлявся помірний позитивний зв'язок між S експресії p53 та ІП ($r = +0,69$; $p < 0,05$). У паціє-

нтів з лімфогенними метастазами S експресії p-53 була більшою за таку у хворих без метастазів (табл. 2).

Висновки

1. ЕР яєчка характеризується превалюванням процесів проліферації над апоптозом в усіх досліджених групах, що поряд з блокуванням антиапоптотичних процесів і збільшенням експресії p53 по мірі зростання стадії пухлинної прогресії говорить про значну агресивність ЕР яєчка.
2. У пацієнтів з віддаленими метастазами індекс проліферації, відносна площа та інтенсивність експресії Ki-67, а також відносна площа експресії Вах були вищими за аналогічні показники у хворих без віддалених метастазів.
3. Індекс проліферації, відносна площа експресії Ki-67, Вах, p-53, а також індекс проліферації були вищими за аналогічні показники у пацієнтів з лімфогенними метастазами, а ніж без них.
4. Виходячи з отриманих даних стосовно експресії bcl-2, можна заключити, що даний маркер не є прогностично значущим в ЕР яєчка.

Перспективи подальших досліджень у цьому напрямку. Планується дослідження проліферативно-апоптотичних процесів в інших гістотипах ГПЯ.

References

1. Burova EA, Bulanov AA, Tryakin AA, Fedyanin MYu, Tyulyandin SA, Matveev VB. Lechenie seminomy yaichka I stadii [Treatment for stage I testicular seminoma]. *Cancer Urology*. 2010; 3: 7–11 [Ukrainian]
2. Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA, editors. World Health Organization Classification of Tumours. *Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs*. Lyon: IARC Press; 2004. 359 p.
3. Trabert B, Chen J, Devesa SS, Bray F, McGlynn KA. International patterns and trends in testicular cancer incidence, overall and by histologic subtype, 1973–2007. *Andrology*. 2015 Jan; 3(1): 4–12. PMID: 2531326; PMCID: PMC4410839. doi: 10.1111/andr.293
4. Fedorenko ZP, Michailovich YY, Goulak LO, Gorokh YeL, Ryzhov AYU, et al. Bulletin of national cancer registry of Ukraine 2017–2018. Kyiv. 2019; 20. [Internet]. Available from: http://www.ncru.inf.ua/publications/BULL_20/index_e.htm

5. Moch H, Humphrey PA, Ulbright ThM, Reuter VE, Eds. *WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs*. Lyons: IARC Press; 2016. 356 p.
6. 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; 82:113–124. PMID: 30041024. doi: 10.1016/j.humpath.2018.07.016
7. *Patent 119922 Ukraine*. Sposib kilkisnoi otsinky rinvia svitlosti ta vidnosnoi ploshchi ekspresii markeriv pry imunohistokhimichnomu doslidzhenni tkany / Potapov SM, Markovskiy VD, Kullshova NE (UA); zayavnik i vlasnik patentu Kharkivskiy natsionalnyi medychnyi universytet (UA); zayavl 2019 Serp 27. [Ukrainian]
8. Kobzar AI. Prikladnaya matematicheskaya statistika. Dlya inzhenerov i nauchnykh rabotnikov. [Internet]. FIZMATLIT, 2012. 816 p. Available from: <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785922113755.html> [Russian]
9. Runyon RP. *Nonparametric Statistics: A Contemporary Approach (Addison–Wesley series in statistics)*. Addison–Wesley Publishing Co; 1977. 218 p.
10. Shatseva TA, Muhina MS. Antigen Ki–67 v otsenke opuholevoy proliferatsii. Ego struktura i funktsii [Ki–67 antigen in the evaluation of tumor proliferation. Its structure and functions]. *Voprosy onkologii*. 2004; 2(50): 157–63. [Russian]
11. Yurin AG, Kovalskiy GB. Issledovanie proliferativnoy aktivnosti po ekspresii antigena Ki–67 v odinochnykh i mnozhestvennykh sinhronnykh epiteliyalnykh opuholyah tolstoy kishki [Proliferative activity by expression of antigen Ki–67 in solitary and multiple synchronous epithelial tumors of the colon]. *Arhiv patologii*. 2005; 5 (67): 38–41. [Russian]
12. Pozharisskiy KM, Leenman EE. Znachenie immunogistohimicheskikh metodik dlya opredeleniya haraktera lecheniya i prognoza opuholevykh zabolevaniy [Role of immunohistochemical techniques in planning treatment and prognosis of tumors]. *Arhiv patologii*. 2000; 5 (62): 3–11. [Russian]
13. Walensky LD, Gavathiotis E. BAX unleashed: the biochemical transformation of an inactive cytosolic monomer into a toxic mitochondrial pore. *Trends Biochem Sci*. 2011 Dec; 36(12): 642–52. PMID: 21978892; PMCID: PMC3454508. doi: 10.1016/j.tibs.2011.08.009
14. Fauvet R, Dufournet C, Poncet C, Uzan C, Hugol D, Daraï E. Expression of pro–apoptotic (p53, p21, bax, bak and fas) and anti–apoptotic (bcl–2 and bcl–x) proteins in serous versus mucinous borderline ovarian tumours. *J Surg Oncol*. 2005 Dec 15; 92(4): 337–43. PMID: 16299808
15. Bose P, Klimowicz AC, Kornaga E, Petrillo SK, Matthews TW, Chandarana S, et al. Bax expression measured by AQUAnalysis is an independent prognostic marker in oral squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*. 2012 Aug 1; 12: 332. PMID: 22852863; PMCID: PMC3487960. doi: 10.1186/1471–2407–12–332
16. Dawson SJ, Makretsov N, Blows FM, Driver KE, Provenzano E, Le Quesne J, et al. BCL2 in breast cancer: a favourable prognostic marker across molecular subtypes and independent of adjuvant therapy received. *Br J Cancer*. 2010 Aug 24; 103(5): 668–75. PMID: 20664598. PMCID: PMC2938244. doi: 10.1038/sj.bjc.6605736
17. Grange F, Petrella T, Beylot–Barry M, Joly P, D'Incan M, Delaunay M, et al. Bcl–2 protein expression is the strongest independent prognostic factor of survival in primary cutaneous large B–cell lymphomas. *Blood*. 2004 May 15; 103(10): 3662–8. PMID: 14726400
18. Pieretti M, Hopenhayn–Rich C, Khatrar NH, Cao Y, Huang B, Tucker TC. Heterogeneity of ovarian cancer: relationships among histological group, stage of disease, tumor markers, patient characteristics, and survival. *Cancer Invest*. 2002; 20(1): 11–23. PMID: 11852993
19. Zolota V, Tsamandas AC, Melachrinou M, Batistatou A, Scopa C. Expression of CD44 protein in renal cell carcinomas: association with p53 expression. *Urol Oncol*. 2002 Jan–Feb; 7(1): 13–7. PMID: 12474536
20. Jones RH, Vasey PA. New directions in testicular cancer; molecular determinants of oncogenesis and treatment success. *Eur J Cancer*. 2003 Jan; 39(2): 147–56. PMID: 12509945

УДК 616.681–006.6–091.8:576.36

**ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
ПРОЛИФЕРАТИВНО–АПОПТОТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В ЭМБРИОНАЛЬНОМ РАКЕ ЯИЧКА
Потапов С. Н., Галата Д. И., Плитень О. Н.**

Резюме. Рост заболеваемости герминогенными опухолями яичка в сочетании с преимущественно молодым возрастом пациентов придает данной проблеме медицинскую и социальную значимость.

Цель исследования – установить особенности пролиферативно–апоптотических процессов в эмбриональном раке яичка.

Исследование выполнено на материале 13 оперatively удаленных яичек, пораженных эмбриональным раком. Опухоли были распределены по степени опухолевой прогрессии согласно pTNM классификации. Для оценки пролиферативно–апоптотических процессов исследовали относительную площадь (S) и интенсивность (L) экспрессии Ki–67, Вах, bcl–2 и p53, а также рассчитывали индекс пролиферации.

Определены рост средних значений S, L экспрессии Ki–67 и индекса пролиферации, а также установлены очень высокая и высокая положительные корреляционные связи между индексом пролиферации и S и L экспрессии Ki–67 ($r=+0,94$; $r=+0,83$ $p<0,05$ соответственно) при переходе от начальных к поздним

стадиям опухолевой прогрессии. S экспрессии Bax также возрастала по мере увеличения стадии опухолевой прогрессии эмбрионального рака, а L экспрессии оставалась слабой независимо от стадии. Установлена высокая положительная корреляционная связь между S экспрессии Bax и S экспрессии Ki-67 с индексом пролиферации ($r=+0,84$; $r=+0,82$; $p<0,05$ соответственно) по мере роста стадии опухолевой прогрессии. У пациентов с отдаленными метастазами и метастазами в лимфатические узлы S экспрессии Bax была больше таковой у больных без метастазов. Активность bcl-2 в эмбриональном раке была незначительной и определялась преимущественно в клетках иммунного инфильтрата. Выявлены очень высокая и высокая отрицательная корреляционная связь между S экспрессии bcl-2 и S экспрессии Ki-67 с индексом пролиферации ($r=-0,92$; $r=-0,88$; $p<0,05$ соответственно) по мере роста стадии опухолевой прогрессии. Корреляционный анализ выявил высокую положительную связь между S экспрессии p53 и S экспрессии Bax и Ki-67 ($r=+0,82$; $r=+0,71$; $p<0,05$ соответственно) по мере роста стадии опухолевой прогрессии и умеренную положительную связь между S экспрессии p53 и индекса пролиферации ($r=+0,69$; $p<0,05$). У пациентов с лимфогенными метастазами S экспрессии p-53 была больше таковой у больных без метастазов. Таким образом, использование маркеров Ki-67, Bax, bcl-2 и p53 в диагностике опухолей яичек целесообразно, так как они отражают злокачественный потенциал опухоли, и могут быть использованы, как прогностические маркеры.

Ключевые слова: эмбриональный рак, пролиферация, апоптоз, иммуногистохимия.

UDC 616.681-006.6-091.8:576.36

Immunohistochemical Characteristics of Proliferative and Apoptotic Processes in Testicular Embryonal Carcinoma

Potapov S. M., Galata D. I., Pliten O. M.

Abstract. Rising of the incidence rate of testicular germ cell tumors in combination with the predominantly young age of patients gives this problem medical and social significance.

The purpose of the work was to establish proliferative and apoptotic processes in testicular embryonal carcinoma.

Material and methods. The study was performed on 13 surgically removed testicles affected by embryonal carcinoma. Tumors were grouped according to the degree of tumorous progression in accordance with the pTNM classification. For evaluation of proliferative and apoptotic processes the relative area (S) and intensity (L) of Ki-67, Bax, Bcl-2, and p53 expression were studied. The proliferation index was calculated as well.

Results and discussion. The study determined increasing of average S, L values of Ki-67 expression and proliferation index. We also revealed very high and high positive correlation between proliferation index and S with L of Ki-67 expression ($r=+0.94$; $r=+0.83$; $p<0.05$, respectively) during the transition from the initial to the late stages of tumorous progression. S of Bax expression was also increasing at the transition from early to late stages of tumorous progression, and L expression remained low regardless of stage. High positive correlation between S of Bax and S of Ki-67 expression and between S of Bax and proliferation index ($r=+0.84$; $r=+0.82$; $p<0.05$, respectively) was revealed during the transition from the initial to the late stages of tumorous progression. In patients with distant metastases and metastases to the lymph nodes S of Bax expression was bigger than that in patients without metastases. The activity of anti-apoptotic protein bcl-2 in the embryonal carcinoma was insignificant and determined predominantly in the cells of immune infiltrate. A very high and high negative correlation was found between S of bcl-2 expression and S of Ki-67 expression with proliferation index ($r=-0.92$; $r=-0.88$; $p<0.05$, respectively) during the transition from the initial to the late stages of tumorous progression. Correlation analysis revealed a high positive relationship between S of p53 expression and S of Bax and Ki-67 expression ($r=+0.82$; $r=+0.71$; $p<0.05$, respectively) during the tumorous progression and a moderate positive relationship between S of p53 expression and proliferation index ($r=+0.69$; $p<0.05$). In patients with lymphogenic metastases S of p-53 expression was bigger than that in patients without metastases ($p<0.05$).

Conclusion. Thus, the use of Ki-67, Bax, bcl-2, and p53 markers in the diagnosis of testicular tumors is advisable, since they reflect the malignant potential of the tumor, and can be used as prognostic markers.

Keywords: embryonal carcinoma, proliferation, apoptosis, immunohistochemistry.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

Стаття надійшла 28.07.2019 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування