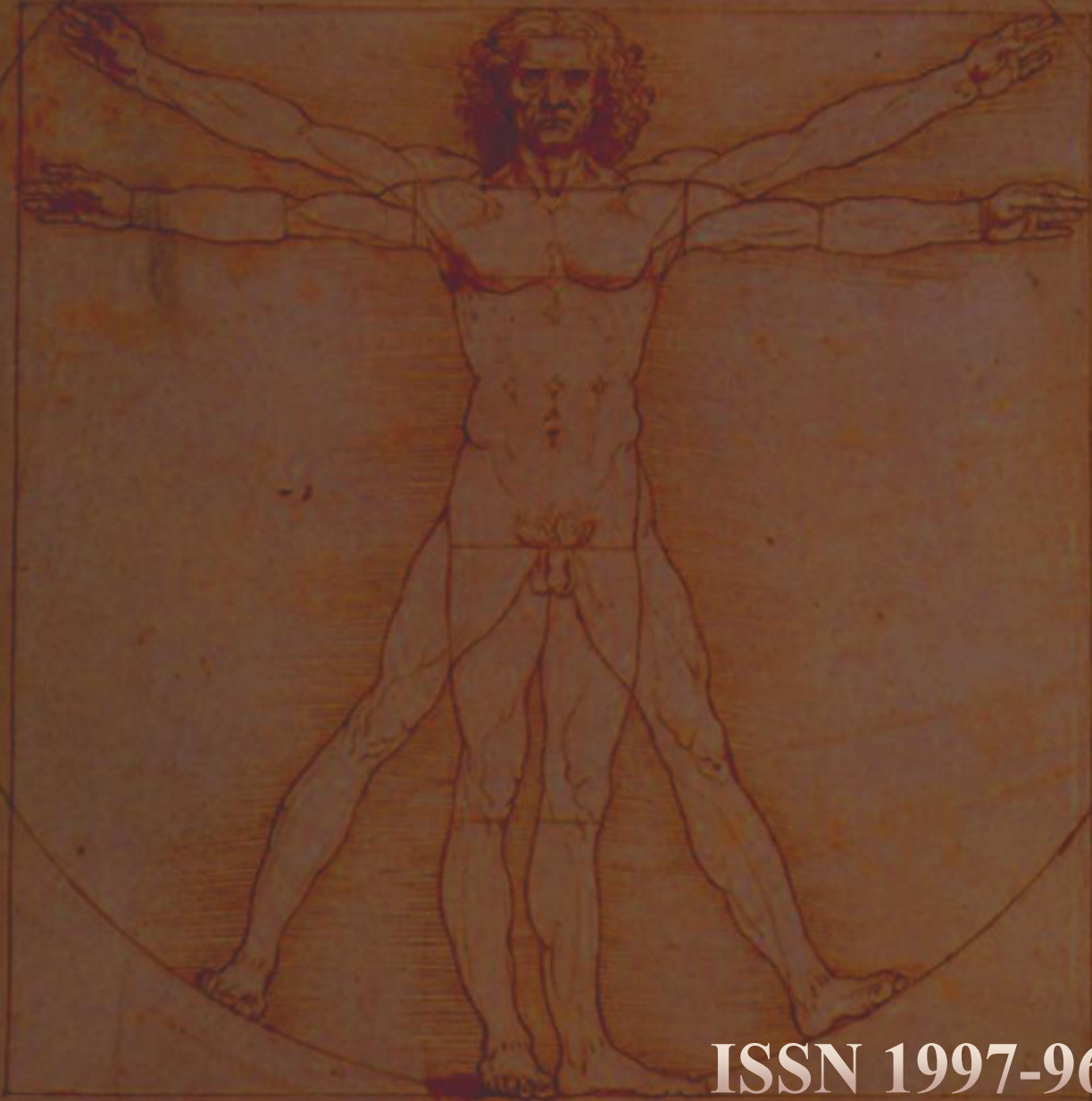


MORPHOLOGIA



ISSN 1997-9665

2022 • Том 16 • Номер 4

2022 • Volume 16 • Number 4

MORPHOLOGIA

2022 • Том 16 • Номер 4

Науковий фаховий електронний журнал Всеукраїнської громадської організації
«Наукове товариство анатомів, гістологів, ембріологів і топографоанатомів України»

Періодичність видання 4 рази на рік

Засновники:

ВГО «Наукове товариство анатомів, гістологів, ембріологів і топографоанатомів України»
Дніпровський державний медичний університет

Індексація журналу:

«NLM Catalog US National Library of Medicine» (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog>)

«Medical Journals Links» (<http://www.medical-journals-links.com>)

«CiteFactor Academic Scientific Journals» (<http://www.citefactor.org>)

«Google Scholar» (<https://scholar.google.com>)

«Directory of Open Access Journals» (<http://doaj.org>)

Національна бібліотека України імені В.І. Вернадського (<http://www.nbuv.gov.ua>)

Атестований як періодичне електронне наукове видання в галузі медичних наук і включений до **Переліку наукових фахових видань України (категорія «Б»)**, в яких можуть публікуватися результати дисертаційних робіт на здобуття наукових ступенів доктора наук, кандидата наук та ступеня доктора філософії (Наказ Міністерства освіти і науки України від 17.03.2020 р. № 409).

Свідоцтво про державну реєстрацію № 26 від 25.04.2014 р.

Головний редактор

Твердохліб І.В.

Редакційна колегія

Аппельханс О.Л., Бондаренко І.М., Бондаренко О.О., Жан Зі, Інджикулян А.А., Ковальчук О.І., Луговський С.П., Луцик О.Д., Маєвський О.Є., Медведєв М.В., Мельник Н.О., Мішалов В.Д., Погорелов М.В., Сулаєва О.М., Туманський В.О., Шпонька В.І., Шпонька І.С.

Редакція

Бондаренко Н.С. (секретар редакції), Кобеза П.А., Черкас О.А.

Оглядові, проблемні й оригінальні статті рецензуються. Журнал публікує наукові роботи морфологів, а також результати морфологічних досліджень фахівців інших спеціальностей.

Видається і рекомендується для вільного поширення мережею Internet згідно з рішенням вченої ради Дніпровського державного медичного університету (протокол № 6 від 28 грудня 2022 року).

Підписано до друку 29.12.2022 р. Умовн. друк. арк. 8.

Адреса редакції: 49005, м. Дніпро, вул. Севастопольська, 19, редакція журналу „Morphologia”.
Тел.: +380974584284. E-mail: morphology.ivt@gmail.com

MORPHOLOGIA

2022 • Volume 16 • Number 4

Scientific specialized electronic journal of the Ukrainian public organization
“Ukrainian scientific Society of Anatomists, Histologists, Embryologists”
Periodicity quarterly

Founders:

Ukrainian scientific Society of Anatomists, Histologists, Embryologists
Dnipro State Medical University

Indexed by:

«NLM Catalog US National Library of Medicine» (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog>)

«Medical Journals Links» (<http://www.medical-journals-links.com>)

«CiteFactor Academic Scientific Journals» (<http://www.citefactor.org>)

«Google Scholar» (<https://scholar.google.com>)

«Directory of Open Access Journals» (<http://doaj.org>)

Vernadsky National Library of Ukraine (<http://www.nbuv.gov.ua>)

Certificated and included in the List of scientific specialized editions in which the main results of scientific works may be published (Order of Ministry of Education and Science of Ukraine № 409 Mar 17, 2020).

Certificate of state registration № 26 Apr 25, 2014.

Editor-in-chief

Tverdokhlib I.V.

Editorial board

Appelhans O.L. (Odessa), Bondarenko I.M. (Dnipro), Bondarenko O.O. (Dnipro), Indzhukulian A.A. (Boston), Kovalchuk O.I. (Kyiv), Lugovskyj S.P. (Kyiv), Lutsyk O.D. (Lviv), Maievskiy O.Ye (Kyiv), Medvediev M.V. (Dnipro), Melnyk N.O. (Kyiv), Mishalov V.D. (Kyiv), Pogorielov M.V. (Sumy), Shponka I.S. (Dnipro), Shponka V.I. (Milwaukee), Sulaieva O.M. (Kyiv), Tumanskiy V.O. (Zaporizhzhia), Zhang Ze (Quebec City).

Editorial staff

Bondarenko N.S. (editorial secretary), Cherkas O.A., Kobeza P.A.

Reviews, critical and research articles are reviewed. Journal publishes scientific works of morphologists and also morphological works of specialists in other fields.

Published and recommended for distribution via the Internet according to the decision of the Academic Council of Dnipro State Medical University (protocol № 6 Dec 28, 2022).

Signed for publishing on Dec 29, 2022. Conventional printed pages 8.

Address: editorial office of journal “Morphologia”, 19 Sevastopolska Str., Dnipro, Ukraine, 49005.
Tel.: +380974584284. E-mail: morphology.ivt@gmail.com

ЗМІСТ

CONTENTS

Оглядові та проблемні статті

Марченко Д.Г., Черкас О.А., Хріпков І.С., Кобеза П.А., Морозова С.Б.
Механізми формування скоротливого апарату кардіоміоцитів при нормальному розвитку та після дії етанолу

Оригінальні дослідження

Марченко Д.Г., Черкас О.А.
Якісні перебудови в ультраструктурі міокарда ембріонів щурів протягом 16-20-ї доби пренатального розвитку у нормі та після дії етанолу

Рахманов В.В., Шпонька І.С.
Дослідження експресії онкопротеїну p53 та EGFR в плоскоклітинних карциномах ротоглотки з позитивним і негативним p16 статусом

Сухін В.С., Грановська Г.І., Данилюк С.В.
Морфологічні особливості терапевтичного патоморфозу раку шийки матки після передопераційної HDR-брахітерапії

Хархаліс І.К., Шпонька І.С., Пославська О.В.
Оцінка експресії маркерів β -catenin та cyclin D1 в залежності від клініко-морфологічних характеристик та проліферативної активності колоректальних карцином

Яковцова І.І., Янчевський О.В.
Окремі клініко-морфологічні та імуногістохімічні критерії прогнозу дрібноклітинного раку легень

Новини, хроніка, історія

Шоста Всеукраїнська конференція «Теорія та практика сучасної морфології»

Рецензії, відгуки, презентації

Войцех Павлина, Майкл Г. Росс. Гістологія: підручник і атлас. З основами клітинної та молекулярної біології: 8-е видання: у 2 томах / Пер. з англ. Том 2. Київ : ВСВ «Медицина». 2021. 624 с.

До відома авторів

Reviews and topical articles

Marchenko D.G., Cherkas H.A., Khripkov I.S., Kobeza P.A., Morozova S.B.
Mechanisms of the formation of the contractile apparatus of the heart during normal development and under the influence of ethanol

Research, original papers

13 Marchenko D.G., Cherkas H.A.
Qualitative changes in the ultrastructure of the myocardium of rat embryos during the 16-20th day of prenatal development in normal conditions and after ethanol exposure

19 Rakhmanov V.V., Shponka I.S.
Study of p53 and EGFR oncoprotein expression in oropharyngeal squamous cell carcinomas with positive and negative p16 status

26 Sukhin V.S., Granovska G.I., Danilyuk S.V.
Morphological features of the therapeutic pathomorphosis of cervical cancer after preoperative HDR-brachytherapy

32 Kharkhalis I.K., Shponka I.S., Poslavska O.V.
Evaluation of the expression of β -catenin and cyclin D1 markers depending on the clinical and morphological characteristics and proliferative activity of colorectal carcinomas

41 Yakovtsova I.I., Yanchevskiy O.V.
Selected clinico-morphological and immunohistochemical criteria for prognosis of small cell lung cancer

News, chronicle, history

47 Sixth All-Ukrainian conference "Theory and practice of modern morphology"

Reviews, comments, presentations

48 Woiciech Pawlina, Michael H. Ross. Histology: A Text and Atlas: With Correlated Cell and Molecular Biology, 8th edition / translated from English. Volume 2. Kyiv : Medytsyna. 2021. 624 p.

54 Author guidelines

Д.Г. Марченко
О.А. Черкас
І.С. Хріпков
П.А. Кобеза
С.Б. Морозова

Дніпровський державний медичний університет, Дніпро

Надійшла: 24.10.2022

Прийнята: 15.12.2022

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2022.4.5-12>

УДК 612.171:611.018:616.127-036.1:547.262

МЕХАНІЗМИ ФОРМУВАННЯ СКОРОТЛИВОГО АПАРАТУ КАРДІОМІОЦИТІВ ПРИ НОРМАЛЬНОМУ РОЗВИТКУ ТА ПІСЛЯ ДІЇ ЕТАНОЛУ

Marchenko D.G.  ✉, Cherkas H.A. , Khripkov I.S. , Kobeza P.A., Morozova S.B. Mechanisms of the formation of the contractile apparatus of the heart during normal development and under the influence of ethanol. Dnipro State Medical University, Dnipro, Ukraine.

ABSTRACT. The review of the article is devoted to the analysis of scientific data related to the mechanism of formation of the contractile apparatus of the heart and the effect on it of such a teratogenic factor as ethanol. Chronic alcohol intoxication causes damage to almost all organs and systems of the body, including the cardiovascular system, causing significant destructive disturbances in its components. To date, there are many studies related to the study of the effect of ethanol on the myocardium [1]. Chronic alcohol intoxication is accompanied by the development of alcoholic cardiomyopathy, which in turn leads to changes in the composition of the heart muscle. Namely, alcohol consumption is associated with a violation of the contractile function of the myocardium and the development of apoptosis of cardiomyocytes. Disturbances in the synthesis of contractile proteins, such as actin and myosin, lipid metabolism and mitochondrial function, transport and binding of calcium are associated with the action of alcohol metabolite acetaldehyde. Violation of the ultrastructure of organelles after the action of ethanol on cardiomyocytes, according to many authors, is characteristic of almost all myocardial cells. The number of organelles decreased, their swelling, disorganization of their internal structure and partial lysis occurred. The largest dystrophic changes observed in the parenchyma of the rat myocardium were manifested in the mosaic structure of myofibrils, disruption of the membranes of the T-system. The process of formation of the contractile components of the myocardium and the effect of ethanol on it is studied by many researchers, however, some aspects are still open. The purpose of this work was to conduct a detailed analysis of literary sources devoted to the mechanism of development of the contractile apparatus of the heart, to analyze the effect of ethanol on the heart as a whole and on its individual contractile components.

Key words: ethanol, cardiomyocytes, myocardium, myofibrils, mitochondria, contractile apparatus, T-system.


Citation:

Marchenko DG, Cherkas HA, Khripkov IS, Kobeza PA, Morozova SB. [Mechanisms of the formation of the contractile apparatus of the heart during normal development and under the influence of ethanol]. Morphologia. 2022;16(4):5-12. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2022.4.5-12>

 Marchenko D.G. 0000-0001-7616-3613

 Khripkov I.S. 0000-0003-0378-8414

 Cherkas O.A. 0000-0001-5422-0189

✉ dasha19862305@ukr.net

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Розвиток серця – складний і динамічний процес, який в кінцевому підсумку призводить до утворення чотирикамерного серця з суцільної трубчастої структури. Відповідно, розвиток окремих компонентів серця також включає в се-

бе певні етапи та механізми. У тому числі, формування компонентів скоротливого апарату, займає значне місце в цьому процесі. Центральне місце у будові та функції серця займають міофібрили, які забезпечують структуру цитос-

келету та силу скорочення, що характеризує кардіоміоцити. Утворення міофібрил вимагає точного впорядкування багатьох структур з подальшим утворенням саркомерів, з'єднаних Z-дисками [1-4].

Порушення механізму утворення основних компонентів скоротливого апарату, в тому числі і міофібрил, під дією тератогенних чинників, може спричинити ряд захворювань і розвитку вад серця. Одним з таких чинників, що все частіше досліджується сучасними науковцями – етанол [5].

За даними багатьох науковців, таких як Gonzalo Guzzo-Merello, Marta Cobo-Marcos, Maria Gallego-Delgado, Pablo Garcia-Pavia та інші, алкоголь є найбільш часто вживаною токсичною речовиною в світі. Доведено, що алкоголь негативно впливає на всі органи та системи органів, у тому числі і на серцево-судинну систему. Вплив високого рівня алкоголю у організмі протягом тривалого періоду життя може призвести до прогресуючої серцевої дисфункції та серцевої недостатності. Вживання алкоголю - це специфічне захворювання серця, відоме як алкогольна кардіоміопатія [6].

Скоротливий апарат серця – це сукупність високоорганізованих сполук, таких як міофібрили, елементи Т-системи, будова та функції яких залежать від етапів онтогенезу [7]. Як зазначається багатьма авторами у своїх статтях, міофібрили мають характерну поперечну смугастість, що зумовлена фізико-хімічною неоднорідністю компонентів, з яких побудований скоротливий елемент. Вони складаються з повторюваних скоротливих одиниць, відомих як саркомери, які є їх структурно-функціональною одиницею [8-11].

Хоча саркомери поперечно-посмугованих м'язів різняться між видами за довжиною та деякими білковими складовими, усі вони мають подібне розташування субодиниць, і в їх основі - трьох основних компонентів: тонкі нитки, товсті нитки та Z-смуги, кожна з яких утворюється в результаті численних взаємодій між білками, які виробляють і контролюють скорочення. У міофібрилах розрізняють *анізотропні* або А-диски (їх ще називають темними смужками) та *ізотропні* або І-диски, які ще називають світлими смужками. У поляризованому світлі темні смуги мають подвійне променезаломлювання, а світлі диски є однопроменезаломлюючими. Внаслідок того, що світлі й темні смужки всіх міофібрил окремого м'язового волокна розташовані на одному рівні, все волокно є поперечносмугастим. В середині кожної І-смуги є тонка темна лінія (пластинка), яка називається *телофрагмою* або лінії-Z. В центрі темної А-смуги наявна більш світла ділянка – Н-зона, або *смужка Гензе*, поперек середини якої розташована темна лінія (пластинка), стара назва

якої *мезофрагма*, її ще називають М-лінією [12,13]. Взаємодії основних білків, відповідальних за утворення та функціонування тонких та товстих ниток описані в роботах таких авторів, як Joseph W. Sanger, Jushuo Wang, Yingli Fan, Jennifer White. Як зазначають автори, одним із найперших етапів кардіоміогенезу є збирання скоротливих білків в організовані структури, здатні до скорочення. Цей процес вимагає полімеризації та збірки кількох різних білків у різні типи ниток, які взаємодіють одна з одною та утворюють саркомери, що містять міофібрили серцевих міоцитів [14].

За даними John C. Sparrow [15], тонкі нитки складаються з ниткоподібного (F)-актину і тропоміозин-тропонінового комплексу. Голови білків міозину II в товстих філаментах зв'язуються з F-актином тонких ниток для процесу скорочення, який регулює тропоміозин-тропоніновий комплекс. Товсті нитки входять до складу ділянки саркомера, так званої А-диску, тоді як тонкі нитки - І-диску. Взаємодія актоміозину створюють скорочувальну силу і саркомери скорочуються за рахунок ковзання двох систем ниток [15].

Електронно-мікроскопічні спостереження John C. Sparrow свідчать, що Z-диски формуються як невеликі, асоційовані з мембраною, агрегати- Z-тільцями, які дозрівають у Z-диски. Кореляційні імунофлуоресцентні та електронномікроскопічні зображення автора показують, що основний білок Z-тілець є α -актинін. Збірки Z-диска кардіоміоцитів вказує на те, що α -актинін, який спочатку рівномірно розподілений, об'єднується в випадково утворені кластери. Потім ці кластери вирівнювання в ділянці майбутніх Z-дисків і решті-решт зливаються в них.

Автор наголошує, що тонкі нитки м'язів додатково містять небулін, важливий білок, який регулює довжину тонких ниток. А також білок тітин, який утворює пружний каркас, що приєднує Z-диск до товстих ниток. Таким чином є два допоміжних білка, які необхідні для нормального функціонування скоротливого апарату – тітин та небулін [15].

Так, наприклад, Miklós Kellermayer, Dominik Sziklai значну роль у процесі міофібрилогенезу надають саме білку тітину. За їх даними, тітин – це гігантський білок, що тягнеться між Z- і М-лініями саркомера. В А-диску тітин пов'язаний з товстою ниткою міозину. Було багато припущень авторами, що тітин може служити шаблоном для формування товстої нитки завдяки здатності повторювати структуру його доменів А-диску [16]. Відповідно, тітин, за даними багатьох дослідників, може бути шаблоном, який визначає довжину та структурну періодичність товстої нитки. Сітка тітину, розташована на поверхні товстої нитки, може відігравати роль у контролі довжини цієї нитки, регулюючи структурну ди-

наміку молекул міозину та встановлюючи механічне обмеження на довжину нитки [16-18].

J. Trínick у своїх статтях окрім тітину виділяє також білок небулін. Він вважає, що ці обидва білки, ймовірно, беруть участь у визначенні та стабілізації високовпорядкованої структури м'язів. I, ймовірно, діючи як «білкові шаблони», щоб точно регулювати складання міозинових і актинових ниток [19].

За даними досліджень K. Wang, небулін являє собою набір нерозтягнутих ниток, прикріплених одним кінцем до лінії Z. Також він наголошує, що нитки небуліну розташовані паралельно, а не послідовно, з нитками тітину. Таким чином, саркомер м'яза може мати два типи неактоміозинових ниток: набір небулінових ниток, пов'язаних із диском I, і набір тітинових ниток, пов'язаних із диском A. За його даними, ця саркомерна модель підвищує ймовірність того, що небулін і тітин можуть діяти як організуючі матриці та фактори, що визначають довжину для актину та міозину відповідно [20]. Knurr C., Luther P.K., Squire J.M. у своїй публікації також наголошують, що довжина спокою саркомера, його робочий діапазон довжин і пасивні еластичні властивості також безпосередньо контролюються властивостями тітину [21].

Будова міофібрили з білків, що входять до її складу, як говорилось вище, вимагає взаємодії багатьох різних компонентів. Багатьма авторами було запропоновано декілька моделей, щоб забезпечити основу для розуміння етапів міофібрилогенезу [22,23]. Так автори виділяють чотири поточні моделі, які намагаються пояснити, як відбувається збірка в поперечносмугастих м'язах хребетних. Моделі припускають: (а) волокноподібні структури під напругою як шаблони для складання міофібрил, (б) утворення, в яких нитки актину та Z-смуги утворюють субодиниці незалежно від субодиниць смуги A, причому обидві згодом з'єднуються разом, щоб утворити міофібрили, (с) преміофібрили як попередники міофібрил, або (д) утворення, що відбувається без будь-яких проміжних структур. Модель преміофібрил, запропонована авторами, обговорюється більш детально, оскільки вона може пояснити міофібрилогенез у різних умовах: *in vivo*, в експлантатах і в дослідженнях тканинної культури серцевих і скелетних м'язів [24-27].

Як і багато авторів Joseph W. Sanger у своїх статтях наголошував, що міофібрили збираються за допомогою триетапної моделі: від преміофібрили до новоутворених міофібрил і зрілих міофібрил. Ця триетапна послідовність була спочатку заснована на дослідженнях живих і фіксованих культивованих клітин серцевого м'яза. На первинних м'язових клітинах птахів і лініях клітин трансгенної скелетної миші Joseph W. Sanger, показав що преміофібрильна модель також характерна для міофібрилогенезу м'язів.

За його даними, преміофібрили характеризуються мінісаркомерами, обмеженими Z-тільцями, що складаються з м'язової ізоформи альфа-актиніну. Актинові нитки з'єднані з цими Z-тільцями та міні-A-смугами, що складаються з нем'язових ниток міозину II. Новоутворені міофібрили формуються, коли преміофібрили вирівнюються та модифікуються при наявності тітину та м'язових ниток міозину II. Зрілі міофібрили утворюються, коли нем'язовий міозин II елімінується з міофібрил і багаті на альфа-актинін Z-тільця зливаються. При цьому відстань між ними збільшується від 0,5 мікрона в преміофібрилах до 2-2,5 мікрона на зрілих міофібрилах.

За даними D. Rhee, J. M. Sanger, J. W. Sanger, преміофібрильна модель характеризується тим, що у ній нем'язовий міозин IIВ, тітин і зейматін відіграють ключові ролі в міофібрилогенезі. Ця модель припускає, що пре- та новоутворені міофібрили складаються з мінісаркомерів, які збільшуються в довжину, ймовірно, за рахунок одночасного подовження актинових ниток, втрати нем'язових ниток міозину II, злиття щільних тілець або Z-тілець з утворенням широкіх Z-смуг, а також захоплення та вирівнювання м'язових ниток міозину II для формування зрілих міофібрил [28].

За даними досліджень Guissou A. Dabiri, Kepan K. Turnacioglu [4], утворення міофібрили включає точне впорядкування кількох субодиниць у ділянки саркомерів. В своїй статті вони наголошують, що завдання дослідження м'язів є окреслення послідовності етапів, що відбуваються в клітині під час збірки товстих і тонких ниток і Z-смуг для формування саркомерів і міофібрил. Їх дослідження відбувалися на основі фарбування антитілами курячих кардіоміоцитів, фіксованих у різний час після розмноження в культурі. За результатами їх досліджень були виявлені, так звані преміофібрили, які характеризуються смугастими візерунками багатих на α -актинін Z-тілець і нем'язового міозину IIВ. Ці структури, за словами авторів, утворюються на периферії кардіоміоцитів. Під час переходу від преміофібрил до міофібрил в статті вказується, що відбувається обмін нем'язових філаментів міозину IIВ на м'язові філаменти міозину II та зростання, та злиття Z-тілець у Z-смуги. Автори наголошують, що Z-тільця спочатку з'являються як дискретні агрегати α -актиніну вздовж преміофібрил. Коли міофібрили збільшуються в ширину, Z-смуги, складаються з латерально вирівняних Z-тілець і, нарешті, безперервних смуг α -актиніну. Друга модель міофібрилогенезу, яку автори відзначають у даній статті, припускає, що перші фібрили, які утворюються на периферії кардіоміоцитів, є тимчасовими каркасами, уздовж яких збираються міофібрили. Нарешті, існує третя гіпотеза, згідно з якою просторово розділені комплекси ниток актину та Z-

смуг, дисків I-Z-I та груп товстих ниток міозину збираються незалежно одна від одної та з'єднуються нитками титину, а потім вставляються на кінці повністю сформованих міофібрил.

Незважаючи на все, що, за останній час, було дуже багато публікацій щодо механізму міофібрилогенезу, але визначення основних етапів цього процесу та розуміння того, як процес ініціюється та контролюється, все ще залишається не до кінця розкритим. Утворення міофібрил в ембріональних м'язових клітинах було досліджено різними засобами. Біохімічні дані показали, що існує координований синтез актину, міозину, тропоміозину та альфа-актиніну під час міофібрилогенезу [29,30]. Імуноцитохімічні та електронно-мікроскопічні дані показують, що товсті (18 нм в діаметрі), тонкі (6 нм діаметром) і нитки титину (діаметром 3 нм) утворюються одночасно в цитоплазмі, а потім організовуються в саркомери [31,32].

Багато авторів вивчали процес міофібрилогенезу. Так, основним підходом у вивченні міофібрилогенезу є культура клітини ембріональних, неонатальних або дорослих кардіоміоцитів (ембріональні клітини птахів розглянуто в статтях Dabigi з колегами, 1999; неонатальні кардіоміоцити щурів розглянуті у White K. (2018); кардіоміоцити дорослих тварин – у Sangher J.W., (1986) [33,34].

Важливим аспектом у формуванні міофібрил є роль білків, що приймають участь в утворенні, підтримці та розташуванні саркомерів [35].

Окрім міофібрил до скоротливого апарату кардіоміоцитів також входять компоненти саркоплазматичного ретикулу – T-трубочки та T-цистерни. Уперше описав поперечно орієнтовані каналці, інвагіновані з сарколеми в клітинах міокарда, ще в 1957 році Лінднер, який спостерігав їх у мускулатурі шлуночків собаки. Однак значення цих інвагінацій не було оцінено до тих пір, поки подібні каналці, які стали відомі як T-трубочки, не були виявлені в клітинах скелетних м'язів і були причетні до зв'язку збудження і скорочення. Відтоді ступінь і природа T-системи в клітинах міокарда ссавців вивчався багатьма дослідниками.

За даними Fabien Brette and Clive Orchard [32], поперечні каналці (T-каналці) міоцитів серцевого шлуночка ссавців є інвагінаціями поверхневої мембрани, які виникають на лінії Z і мають як поперечні, так і поздовжні елементи. Нещодавні дослідження цих вчених показали, що структура і функція T-каналців є більш складними, ніж вважалося раніше; зокрема, багато білків, які беруть участь у клітинному циклі Ca²⁺, ймовірно, зосереджені в T-каналці. Таким чином, T-каналці є важливою детермінантою функції серцевих клітин, особливо як основне місце сполучення збудження-скорочення, забез-

печуючи просторово та тимчасове синхронне вивільнення Ca²⁺ у всій клітині. Зміни в структурі T-каналців і експресії білка відбуваються під час розвитку та при серцевій недостатності, тому зміни в T-каналцях можуть сприяти функціональним змінам, що спостерігаються в цих умовах.

За даними дослідників, у серцевій тканині ссавців T-каналці зустрічаються переважно в шлуночкових міоцитах, вони або відсутні, або набагато слабше розвинені в передсердях. T-каналці є інвагінаціями сарколеми та глікокаліксу, які залишаються пов'язаними з сарколемою всередині T-каналців. Дослідження серцевого м'яза показали, що вони виникають на лінії Z, на кінці кожного саркомера. T-трубчаста система не є простою поперечною системою трубочок, а є складною системою розгалужених трубочок з поперечними та поздовжніми елементами. T-каналці серцевого м'яза мають середній діаметр ≈200-300 нм, хоча в межах одного шлуночкового міоцита щура діаметр окремих каналців може коливатися від 20 до 450 нм, але більше половини T-каналців мають діаметри від 180 до 280 нм. За даними авторів, у типових клітинах міокарда шлуночків можна розрізнити кілька компонентів в системі T, а саме: (а) первинні поперечні каналці, (б) вторинні поперечні каналці, (с) поздовжні каналці і (д) третинні поперечні каналці. Первинні трубочки були орієнтовані під прямим кутом до довгої осі міофібрили і зазвичай розташовані на рівні I-смуги. Ці трубочки мали середній діаметр близько 130 нм. Вторинні T-трубочки, за даними автора, виникали безпосередньо з первинних інвагінацій і тягнулися уздовж довгої осі клітини, утримуючи рівно I-диск і Z-лінію; вони були досить вузькі (51 нм у діаметрі) і не мали розгалужень. Типові сполуки розташовувалися між вторинними T-трубочками і суміжними гілками саркоплазматичного ретикулу, але вони зустрічалися рідше, ніж з'єднання з первинними трубочками [32].

Поздовжні трубочки T-системи також прямі гілки первинної інвагінації. Вони розташовувалися паралельно міофібрилам, і багато з них тягнулися уздовж саркомера. Але, за даними авторів, немає підстав вважати, що яка-небудь із цих поздовжніх трубочок перетинала Z-лінію. Поздовжні трубочки, як правило, мали розмір приблизно 64 нм діаметром.

Третинні поперечні трубочки були дуже вузькі (25-30 нм діаметром), зрідка з'єднувалися з поздовжніми трубочками A-диска міофібрили. Вони проходили там, де товсті нитки перекриваються тонкими нитками. Саркоплазматичний ретикулум у клітинах міокарда шлуночка, за даними статті, мав систему каналців сильно розгалужених у цитоплазмі. Ці елементи саркоплазматичного ретикулу були більш вузькими

(близько 38 нм діаметром), ніж будь-яка частина Т-системи, за винятком, мабуть, третинних Т-трубочок. Саркоплазматичний ретикулум утворював численні з'єднання з Т-системою, особливо це стосувалося первинних каналців. Крім того, плоскі мішечки саркоплазматичного ретикулума часто утворювали подібні з'єднання (тобто розрив становив близько 10-12 нм) з поверхнею сарколеми. В області диска цистерни саркоплазматичного ретикулума були пов'язані з «неспеціалізованими» ділянками сарколеми, де міжклітинні розриви становили близько 20 нм. Найбільш часто прилегла цистерна саркоплазматичного ретикулума знаходилася тільки на одній стороні з'єднаної мембрани, але, нерідко цистерни можна було бачити з обох сторін. Примітною особливістю клітин шлуночка міокарда була часта присутність вузької трубочки (30-40 нм) у безпосередній близькості від Z-лінії міофібрил [36].

Вплив етанолу на серцево-судинну систему все частіше і частіше згадується, як основна критична проблема, що з кожним роком все привертає до себе увагу.

Було розглянуто кілька механізмів, за допомогою яких етанол шкодить серцю. До них відноситься пряма токсична дія, дія метаболітів етанолу та нейрогуморальний механізм.

За даними багатьох досліджень було встановлено, що хронічна алкогольна інтоксикація викликає зміни у міокарді на всіх рівнях його структурної організації [37,38]. Перш за все, за даними Joaquim Fernández-Solà, тератогенні зміни, які викликані дією етанолу, впливали на розвиток кардіоміоцитів у процесі ембріогенезу, що сприяло недорозвинутості морфології або функції серцевих клітин. Joaquim Fernández-Solà у своїх дослідженнях показав, що у першу чергу етанол впливав на загальний вигляд серцевих м'язових клітин.

Алкогольна дилатаційна кардіоміопатія є найбільш поширеною формою ураження серця, викликаного етанолом. За даними Joaquim Fernández-Solà кардіоміопатія викликає прогресуюче зниження скоротливості міокарда та дилатацію камер серця, що призводить до виникнення серцевої недостатності та аритмій. Патологічно етанол індукує міоцитоліз, апоптоз і некроз міоцитів, механізми відновлення яких спричиняють гіпертрофію та інтерстиціальний фіброз. Мішені етанолу міоцити включають зміни в мембранному складі, рецепторах, іонних каналах, внутрішньоклітинних $[Ca^{2+}]$ перехідних процесах і структурних білках, а також порушують скорочувальну здатність саркомерів [39]. Одним із найважливіших патофізіологічних механізмів алкогольної кардіоміопатії є те, що етанол надає прямий токсичний вплив на структури кардіоміоцитів (мембрану, рецептори, мітохондрії, міофібрили). Це пов'язано з тим, що моле-

кула етанолу має невеликий розмір і володіє високою реакційною здатністю, проникати крізь клітинні мембрани і пошкоджувати не тільки мембранні рецептори і канали, але і внутрішньоклітинні частинки, в тому числі мітохондрії, міофібрили та ядро. Таким чином, етанол посилює проникнення клітинних мембран, порушує сигнальні механізми і активує процеси апоптозу кардіоміоцитів [40-42].

Так, оцінці гістологічних препаратів серця щурів після введення етанолу Segel L.D. [43] описує, що спостерігалася гетерогенність різних ділянок міокарда. Так, спостерігались участки міокарда в яких щільність розташування кардіоміоцитів була на 11% вище, ніж в контрольній групі ($p < 0,05$). При дослідженні ультраструктурної організації кардіоміоцитів у споживачів психоактивних речовин спостерігали структурні признаки набухання клітин, про що свідчило збільшення об'ємної щільності цитоплазми кардіоміоцитів, при цьому відзначалося збільшення на 23% ($p < 0,05$) об'ємної щільності міофібрил. Крім того, відзначалося зменшення об'ємної щільності мітохондрій на 49% ($p < 0,05$). Крім того, мали місце клітини, в яких спостерігались утворення великих вакуолей, які склали 13% ($p < 0,05$) від об'єму цитоплазми. При цьому, була знижена на 33% об'ємна щільність міофібрил і відзначено зменшення на 29% об'ємної щільності мітохондрій ($p < 0,05$) [43].

Експериментальні дослідження на білих щурах, викликаючи алкогольною кардіоміопатію внутрішньошлуночковим введенням, за допомогою металевих зондів, 20% розчину етанолу у дозі 8 г/кг протягом 90 днів, встановили ряд змін у структурі серця цих тварин. В результаті проведених досліджень було встановлено, що на 30-ту добу після 90-добової алкоголізації у тварин формується алкогольна кардіоміопатія (АКМП) - гістологічно визначено деструктивні зміни кардіоміоцитів, що виявляються у вигляді фуксинофілії, анізотропії, накопичення у саркоплазмі вільних ліпідів. Поряд з даними змінами у міокарді виявлялися явища проліферації сполучнотканинних елементів та осередкове ожиріння міокарда та розвиток вираженого периваскулярного кардіосклерозу. Особливу увагу привертало достовірне зниження у тварин контрольної групи ядерно-цитоплазматичного коефіцієнта на 26,2% і щільності ядер на 19,1% порівняно з інтактними тваринами, що відображає наявність у них патологічної гіпертрофії міокарда, апоптозу та загибелі кардіоміоцитів.

Joaquim Fernández-Solà з співавторами у своїй статті наголошував, що хронічне зловживання етанолом пригнічує синтез і деградацію білка, залучаючи як структурні, так і неструктурні білки серця. Патологічні зміни, під час дії етанолу, проявляються у зміні форми Z-лінії саркомерів і порушення їх візерунка, що призводить

до міоцитолізу. Міоцитоліз проявляється наступним чином - розчинення міофібрил, вакуолізацію клітин і розлад волокон. На саркомерний комплекс також впливає етанол, зменшуючи вміст титину, білка, який відповідає за розслаблення саркомерів і розтяжність. За дослідженням автора статті, етанол також знижує чутливість міофіламентів до Ca^{2+} . Крім того, етанол також впливає на скоротливі білки саркомерів, такі як міозин, актин і тропонін, що спричиняє функціональну прогресуючу дисфункцію скоротливої здатності міоцитів, викликаючи прогресуючий розвиток серцевої недостатності.

Gardner J.D. з співавторами [44] у своїх дослідженнях довели, що хронічне вживання алкоголю у дорослих може викликати кардіоміопатію, аритмію та серцеву недостатність. У новонароджених пренатальний вплив алкоголю може збільшити ризик вроджених вад серця. У серцевих клітинах, на які впливає етанолом, спостерігалися підвищена загибель, окислювальний стрес, порушення обробки Ca^{2+} , аномальний потенціал дії, змінена скоротувальна здатність і пригнічений розвиток структури. За даними автора, новоутворені філаменти під час їх синтезу та дозрівання збираються у пучки міофібрил. Але у процесі новоутворення при дії етанолу відбувається порушення їх нормальної орієнтації і надмірний ріст їх у довжину, проявляється збільшення відстані між сусідніми Z-смугами [44].

За допомогою електронної мікроскопії було досліджено, що при дії алкоголю на кардіоміоцити у постнатальний період спостерігалися як міофібрили з менш щільною упаковкою, так і з порожнечами, які займали значні ділянки саркомера [45]. За даними експериментальних досліджень Ren J. зі співавторами [46] було показано на електронограмі збільшення відстані між сусідніми міофібрилами після хронічної дії етанолу на міокард щурів. Стоншені міофібрили мали контур, який нагадує контур бамбукового стовбура. При дії етанолу на кардіоміоцити спо-

стерігалось порушення орієнтації міофібрил. Так деякі міофібрили розташовувалися перпендикулярно відносно осі кардіоміоцита, інші розходилися вбік від однієї Z-лінії і перетиналися один з одним [46].

Movva R., Figueredo V.M. у своїх дослідженнях зауважили, що механізм серцевої недостатності тісно пов'язаний з порушенням порядку розташування T-каналців, що може бути викликано цілим рядом патологічних змін, у тому числі й алкогольною кардіоміопатією. За даними експериментальних досліджень зміни у T-трубочках є початком патогенного механізму розвитку порушень скорочення серця. Порушення скоротливої здатності при алкогольній кардіоміопатії було пов'язано зі зменшенням синхронного випуску Ca^{2+} . При цьому відбувалося пошкодження клітинних мембран і скоротувальних білків кардіоміоцитів. Дане явище призводило до накопичення у кардіоміоцитах іонів Na^{+} і втрати іонів K^{+} . Одночасно порушувалася діяльність Ca^{2+} – АТФ-ази, внаслідок чого спостерігалось масивне надходження іонів Ca^{2+} і їх зв'язування саркоплазматичним ретикуломом – депо іонів кальцію [47]. У 1988 році Richardson P.J. та колеги у серії блискавич експериментів на ізольованому сосочковому м'язі під впливом розчину етанолу довели, що алкоголь втручається у м'язове скорочення і порушує його [48].

Підсумок

Зловживання алкоголем є серйозною медичною та соціально-економічною проблемою сьогодення, що впливає майже на усі органи, спричиняючи значні патогенні порушення, у тому числі і міокарда. Хронічне та надмірне вживання алкоголю може призвести до прогресуючої серцевої дисфункції та серцевої недостатності. Особливо токсично етанол впливає на внутрішньоутробний період розвитку, що може спричинити порушення механізму формування скоротливого апарату серця, веде до розвитку численних вад серця, а також летальних випадків.

Літературні джерела References

1. Conlon S. Teratogenic Effects of Prenatal Alcohol Exposure on Cardiac Innervation. *Pediatrics*. 2021;3(147):368–369.
2. Fernández-Solà J. The Effects of Ethanol on the Heart: Alcoholic Cardiomyopathy. *Nutrients*. 2020;12(2):572.
3. Borisov AB. Myofibrillogenesis and reversible disassembly of myofibrils as adaptive reactions of cardiac muscle cells. *Acta Physiologica Scand*. 1991;142(599):71–80.
4. Dabiri GA, Turnacioglu KK, Sanger JM, Sanger JW. Myofibrillogenesis visualized in living embryonic cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(17):9493–8.
5. Bryson CL, Mukamal KJ, Mittleman MA, Fried LP, Hirsch CH, Kitzman DW, Siscovick DS. The association of alcohol consumption and incident heart failure: the Cardiovascular Health Study. *J Am Coll Cardiol*. 2006;48:305–311.
6. Guzzo-Merello G, Cobo-Marcos M, Gallego-Delgado M, Garcia-Pavia P. Alcoholic cardiomyopathy. *World J Cardiol*. 2014;6(8):771–781.
7. Allwork SP. Heart Muscle: Ultrastructural Studies. *J Anat*. 1988;159:200–206.

8. Sanger JM, Mittal B, Pochapin MB, Sanger JW. Myofibrillogenesis in living cells microinjected with fluorescently labeled alpha-actinin. *Journal of Cell Biology*. 1986;102(6):2053–2066.
9. Sanger JW, Kang S, Siebrands CC. How to build a myofibril. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. 2005;26(6):343–354.
10. Wang SM, Greaser ML, Schultz E, Bulinski JC, Lin JJ, Lessard JL. Studies on cardiac myofibrillogenesis with antibodies to titin, actin, tropomyosin, and myosin. *The Journal of Cell Biology*. 1988;107:1075–1083.
11. Wang K, Wright J. Architecture of the sarcomere matrix of skeletal muscle: immunoelectron microscopic evidence that suggests a set of parallel inextensible nebulin filaments anchored at the Z line. *J Cell Biol*. 1988;107(6 Pt 1):2199–212.
12. Du A, Sanger JM, Sanger JW. Cardiac myofibrillogenesis inside intact embryonic hearts. *Dev Biol*. 2008;318(2):236–46.
13. Morimoto S. Sarcomeric proteins and inherited cardiomyocytes. *Cardiovascular Research*. 2008;77:659–666.
14. Sanger JW, Wang J, Fan Y, White J, Mi-Mi L, Dube DK, Pruyne D. Assembly and maintenance OF myofibrils in striated muscle. *The Actin Cytoskeleton*. 2016;3(1):39–75.
15. Sparrow JC, Schöck F. The initial steps of myofibril assembly: integrins pave the way. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(4):293–298.
16. Kellermayer M, Sziklai D, Papp Z, Decker B, Lakatos E, Mártonfalvi Z. Topology of interaction between titin and myosin thick filaments. *J Struct Biol*. 2018;203(1):46–53.
17. Granzier HL, Labeit S. The giant muscle protein titin is an adjustable molecular spring. *Exerc Sport Sci Rev*. 2006;34:50–53.
18. Sanger JW, Sanger JM. Green fluorescent proteins improve myofibril research. *Biophotonics International*. 2001;8(3):44–46.
19. Trinick J, Tskhovrebova L. Titin: a molecular control freak. *Trends Cell Biol*. 1999;9(10):377–80.
20. Wang J, Shaner N, Mittal B, Zhou Q, Chen J, Sanger JM, Sanger JW. Dynamics of Z-band based proteins in developing skeletal muscle cells. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2005;61(1):34–48.
21. Knupp C, Luther PK, Squire JM. Titin organisation and the 3D architecture of the vertebrate-striated muscle I-band. *Journal of Molecular Biology*. 2002;322(4):731–739.
22. Kontrogianni-Konstantopoulos A, Catino DH, Strong JC, Sutter S, Borisov AB, Pumplin DW, Russell MW, Bloch RJ. Obscurin modulates the assembly and organization of sarcomeres and the sarcoplasmic reticulum. *FASEB J*. 2006;20:2102–2111.
23. Lange S, Ehler E, Gautel M. From A to Z and back? Multicompartment proteins in the sarcomere. *Trends in Cell Biology*. 2006;16(1):11–18.
24. LoRusso SM, Rhee D, Sanger JM, Sanger JW. Premyofibrils in spreading adult cardiomyocytes in tissue culture: evidence for reexpression of the embryonic program for myofibrillogenesis in adult cells. *Cell Motil Cytoskeleton*. 1997;37(3):183–98.
25. Rhee D, Sanger JM, Sanger JW. The premyofibril: evidence for its role in myofibrillogenesis. *Cell Motil Cytoskeleton*. 1994;28(1):1–24.
26. Sanger JW, Ayoub JC, Chowrashi P, Zurawski D, Sanger JM. Assembly of myofibrils in cardiac muscle cells. *Adv Exp Med Biol*. 2000;481:89–102.
27. Sanger JW, Chowrashi P, Shaner NC, Spalthoff S, Wang J, Freeman NL, Sanger JM. Myofibrillogenesis in skeletal muscle cells. *Clin Orthop Relat Res*. 2002;(403 Suppl):153–62.
28. Segel LD, Rendig SV, Choquet Y, Chacko K, Amsterdam EA, Mason DT. Effects of chronic graded ethanol consumption on the metabolism, ultrastructure, and mechanical function of the rat heart. *Cardiovasc Res*. 1975;9(5):649–663.
29. Borisov AB, Goncharova EI, Pinaev GP, Rumyantsev PP. [Changes in α -actinin localization and myofibrillogenesis in rat cardiomyocytes in culture]. *Tsitologia*. 1989;31:642–646. Russian.
30. Huxley HE. Electron microscope studies on the structure of natural and synthetic protein filaments from striated muscle. *Journal of Molecular Biology*. 1963;7:281–308.
31. Ayettey AS, Navaratnam V. The T-tubule system in the specialized and general myocardium of the rat. *Journal of Anatomy*. 1978;127(Pt 1):125–140.
32. Brette F, Orchard C. T-Tubule Function in Mammalian Cardiac Myocytes. *Circulation Research*. 2003;92:1182–1192.
33. Sanger JW, Mittal B, Sanger JM. Formation of myofibrils in spreading chick cardiac myocytes. *Cell Motility*. 1984;4(6):405–416.
34. White J, Wang J, Fan Y, Dube D, Sanger JW, Sanger JM. Myofibril Assembly in Cultured Mouse Neonatal Cardiomyocytes. *Anat Rec (Hoboken)*. 2018;301(12):2067–2079.
35. Ehler E, Fowler VM, Perriard JC. Myofibrillogenesis in the developing chicken heart: role of actin isoforms and of the pointed end actin capping protein tropomodulin during thin filament assembly. *Dev Dyn*. 2004;229(4):745–55.
36. Soeller C, Cannell MB. Examination of the transverse tubular system in living cardiac rat myocytes by 2-photon microscopy and digital image-processing techniques. *Circ Res*. 1999;84:266–275.
37. Conrad AH, Jaffredo T, Conrad GW. Differential localization of cytoplasmic myosin II isoforms a and B in avian interphase and dividing embryonic and immortalized cardiomyocytes and other cell types in vitro. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. 1995;31(2):93–112.
38. Ferrans VJ, Hibbs RG, Weilbaecher DG,

Black WC, Walsh JJ, Burch GE. Alcoholic cardiomyopathy; a histochemical study. *Am Heart J.* 1965;69:748–765.

39. Fernández-Solà J, Junyent JM, Urbano-Márquez A. Alcoholic myopathies. *Curr Opin Neurol.* 1996;9(5):400–5.

40. Hajnóczky G, Buzas CJ, Pacher P, Hoek JB., Rubin E. Alcohol and mitochondria in cardiac apoptosis: Mechanisms and visualization. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 2005;29:693–701.

41. Piano MR. Alcohol's effects on the cardiovascular system. *Alcohol Res.* 2017;38:219–241.

42. Rubin E. Alcoholic myopathy in heart and skeletal muscle. *N Engl J Med.* 1979;301:28–33.

43. Segel LD, Rendig SV, Choquet Y, Chacko K, Amsterdam EA, Mason DT. Effects of chronic graded ethanol consumption on the metabolism, ultrastructure, and mechanical function of the rat heart.

Cardiovasc Res. 1975;9(5):649–663.

44. Gardner JD, Mouton AJ. Alcohol effects on cardiac function. *Compr Physiol.* 2015;5(2):791–802.

45. Thomas AP, Rozanski DJ, Renard DC, Rubin E. Effects of ethanol on the contractile function of the heart: a review. *Alcohol Clin Exp Res.* 1994;18(1):121–31.

46. Ren J, Wold LE. Mechanisms of alcoholic heart disease. *Adv. Cardiovasc. Dis.* 2008;2:497–506.

47. Movva R, Figueredo VM. Alcohol and the heart: to abstain or not to abstain? *Int J Cardiol.* 2013;164:267–276.

48. Richardson PJ, Patel VB, Preedy VR. Alcohol and the myocardium. *Novartis Found. Symp.* 1998;216:35–45.

Марченко Д.Г., Черкас О.А., Хріпков І.С., Кобеза П.А., Морозова С.Б. Механізми формування скоротливого апарату кардіоміоцитів при нормальному розвитку та після дії етанолу.

РЕФЕРАТ. Оглядова стаття присвячена аналізу наукових даних, що пов'язані з механізмом формування скоротливого апарату серця та впливом на нього такого тератогенного чинника, як етанол. Хронічна алкогольна інтоксикація викликає ураження майже усіх органів та систем організму, у тому числі впливаючи на серцево-судинну систему та викликаючи значні деструктивні порушення у складі її компонентів. Ведеться багато досліджень, пов'язаних з вивченням впливу етанолу на міокард. Хронічна алкогольна інтоксикація супроводжується розвитком алкогольної кардіоміопатії, що в свою чергу призводить до змін у складі серцевого м'яза. А саме, вживання алкоголю асоціюється з порушенням скоротливої функції міокарда та розвитком апоптозу кардіоміоцитів. З дією метаболіту алкоголю ацетальдегіду пов'язують порушення синтезу скоротливих білків, таких як актин та міозин, метаболізму ліпідів та функції мітохондрій, транспорту та зв'язування кальцію. Порушення ультраструктури органел після дії етанолу на кардіоміоцити, за даними багатьох авторів, характерне майже для всіх клітин міокарда. Кількість органел зменшувалась, відбувалося їх набряк, дезорганізація їхньої внутрішньої структури та частковий лізис. Найбільші дистрофічні зміни, що спостерігалися у паренхімі міокарда щурів, проявлялися у мозаїчній структурі міофібрил, порушення мембран Т-системи. Процес формування скоротливих компонентів міокарда та вплив на нього етанолу вивчається багатьма дослідниками, однак, деякі аспекти ще залишаються відкритими. Метою даної роботи було провести детальний аналіз літературних джерел, присвячених механізму розвитку скоротливого апарату серця, проаналізувати вплив етанолу на серце, в цілому, та на окремі його скоротливі компоненти.

Ключові слова: етанол, кардіоміоцити, міокард, міофібрили, мітохондрії, скоротливий апарат, Т-система.

Д.Г. Марченко
О.А. Черкас

Дніпровський державний
медичний університет,
Дніпро



Надійшла: 24.10.2022

Прийнята: 15.12.2022

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2022.4.13-18>

УДК 611.018.63:611.013.9:547.262:616.127-091.8-092.9

ЯКІСНІ ПЕРЕБУДОВИ В УЛЬТРАСТРУКТУРІ МІОКАРДА ЕМБРІОНІВ ЩУРІВ ПРОТЯГОМ 16-20-Ї ДОБИ ПРЕНАТАЛЬНОГО РОЗВИТКУ У НОРМІ ТА ПІСЛЯ ДІЇ ЕТАНОЛУ

Marchenko D.G.  , Cherkas H.A.  Qualitative changes in the ultrastructure of the myocardium of rat embryos during the 16-20th day of prenatal development in normal conditions and after ethanol exposure. Dnipro State Medical University, Dnipro, Ukraine.


ABSTRACT. Background. Violation of the formation of the components of the cardiovascular system even in the embryonic period can be caused by various endo- and exogenous factors, which in the future can lead to both the development of heart defects and deaths. Therefore, at present, with the help of many research works on the mechanism of myofibrillogenesis in cardiomyocytes (CMC), the attention of researchers has been drawn to the question of the main changes that occur in the structure of the main elements of the contractile apparatus under the influence of various teratogenic factors. The use of a powerful complex of research methods in the disclosure of this issue led to significant research in the analysis of this topic. The **aim** of the study was to compare the changes in the ultrastructure of the contractile apparatus of rat cardiomyocytes during the late stages of prenatal development during normal development and after the teratogenic effect of ethanol. **Results and conclusion.** The article is devoted to the analysis of changes in the ultrastructure of the ventricular myocardium of rat embryos during late prenatal development. Electron-microscopic methods were used for this study, followed by analysis of electrongrams. Research results indicate that alcohol intoxication led to destructive changes in the structure of the contractile apparatus of cardiomyocytes (CMC) during the entire development of rat embryos. Electron microphotographs revealed the main changes in the ultrastructure of the A- and I-discs of myofibrils, violations of the integrity of sarcomeres, changes in the shape of intercalated discs and the Z-disc. This article also draws attention to changes in the structure of triad elements, mitochondria, both in normal conditions and after exposure to ethanol.


Key words: ethanol, myocardium, myofibrils, mitochondria, contractile apparatus, T-system.


Citation:

Marchenko DG, Cherkas HA. [Qualitative changes in the ultrastructure of the myocardium of rat embryos during the 16-20th day of prenatal development in normal conditions and after ethanol exposure]. Morphologia. 2022;16(4):13-8. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2022.4.13-18>

 Marchenko D.G. 0000-0001-7616-3613

 Cherkas O.A. 0000-0001-5422-0189

 dasha19862305@ukr.net

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Вступ

Протягом останніх років захворювання органів серцево-судинної системи залишаються одними з серйозним проблем, як в Україні окремо, так і в цілому в усьому світі. Це пов'язано зі значним зростанням та розповсюдженням даного захворювання не лише у дорослої людини, а і у немовлят. Ці захворювання можуть бути викликані різними зовнішніми та внутрішніми факто-

рами. У тому числі розвиток численних вад серця може бути пов'язане з дефектами, що сформувались ще у ембріональному періоді, не вірною закладкою певних компонентів серця, у тому числі і скоротливих, що в свою чергу призведе до значних відхилень.

Скоротливий апарат серця являє собою високоорганізовану структуру, яка включає - міофібрили, елементи Т- та L-систем.

Міофібрили є основною скоротливою одиницею скоротливого апарату, які побудовані з упорядкованих актинових та міозинових ниток. Задля утворення такої структури міофібрили кардіоміоцитів проходили кілька етапів дозрівання. Цей процес має назву міофібрилогенез [1,2,3,4,5].

Міофібрилогенез – це складний процес, який являє собою утворення і розподіл міофібрил у кардіоміоциті, формування скоротливих білків і утворення саркомерів [6,7,8,9]. Так, порушення цього процесу, може призвести до значних змін у їх структурі, що в свою чергу може викликати навіть летальні випадки.

Ці зміни можуть бути пов'язані, як генетичними факторами, так і різними патогенними чинниками, у тому числі і впливом етанолу.

Однак, незважаючи на численні дослідження в області кардіогенезу, багато питань зв'язаних з механізмом розвитку серця, у тому числі. Тому вивчення процесу формування його скоротливого апарату є дуже важливим аспектом для сьогодення.

Мета дослідження – порівняти зміни в ультраструктурі скоротливого апарату кардіоміоцитів щурів, протягом пізніх етапів пренатального розвитку під час нормальному розвитку та після тератогенної дії етанолу.

Матеріали та методи

Експериментальні дослідження були проведені на 30 білих щурах-самках масою 250-300 г, що утримувались на стандартному раціоні виваг [10]. Моделювання алкогольної інтоксикації здійснювали впродовж шести тижнів шляхом повної заміни питної води на розчин етанолу. Концентрація етанолу змінювалась кожні два тижні – 5%, 10%, 15%, 20% розчин [11]. 20%-ний розчин надавався щурам не 2 тижня, а 4 тижня. У ході експерименту тварини були розділені на дві групи: I група – тварини, які утримувались у нормальних умовах і не отримували етанол (контроль); II група – щури, які отримували етанол у різній концентрації (експеримент). Після закінчення експерименту здійснювали евтаназію тварин шляхом декапітації під інтраперитонеальним наркозом з використанням стандартного розведення тіопенталу натрію у дозі 0,15 мл на 100 г маси тіла щура. Після декапітації матеріал фіксували при температурі +2°C протягом 3-4 годин у 2,5%-ному розчині глютаральдегіду (виготовленому на 0,2М фосфатному буфері рН=7,4) з наступною постфіксацією протягом 1 години у 1%-ному забуференому (рН=7,4) розчині тетроксиду осмію («SPI», США), зневодненням у спиртах зростаючої концентрації та пропілені оксиді та виготовленням епоксидних блоків з використанням епон-аралдиту [12]. Ультратонкі зрізи виготовляли на ультрамикротомі УМТП-6М («SELMI», Україна) та розміщали на опорних сітках (Mesh Regular Grid 200).

Проведення експерименту здійснювалось із дотриманням принципів біоетики, що викладені у Хельсінській декларації Всесвітньої медичної асоціації про гуманне ставлення до тварин, а також згідно до Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 15.12 2009 р. № 1759-VI та «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Київ, 2001).

Якісні параметри визначали за допомогою аналізу електронограм, виготовлених у лабораторії електронної мікроскопії ДДМУ.

Результати та їх обговорення

Після алкоголізації тварин за допомогою електронної мікроскопії було встановлено, що зміни в ультраструктурі міокарда залежали від доби розвитку серця. У ранньому пренатальному періоді серед мало змінених клітин зустрічалась лише невелика кількість з проявами деструкції. Під час електронно-мікроскопічних досліджень, ультраструктури кардіоміоцита, значних змін у міофібрилярному, мітохондріальному апараті та саркоплазматичному ретикулумі не спостерігалась. Ультраструктура міофібрил була майже незмінна, мітохондрії збільшені за розміром зустрічались рідко, цистерни та трубочки саркоплазматичного ретикулума мали звичайну форму. Однак, поряд з такими клітинами, спостерігалися кардіоміоцити з частковим лізисом елементів міофібрилярного апарату. Т-система на ранніх етапах онтогенезу також не була значно зміненою, і являла собою систему коротких каналців та трубочок.

Гістологічними і морфометричними дослідженнями виявлено, що найсуттєвіші зміни при алкогольному пошкодженні серця відбувались на рівні міофібрилярного апарату. Так, на 16-у добу пренатального розвитку ембріонів щурів розташування, форма і розміри серцевих клітин значно відрізнялись від кардіоміоцитів інтактних тварин. Міофібрили в цих клітинах були значно стоншеними і втрачали свою цілісність. Відбувалась деструкція окремих саркомерів, порушення орієнтації і лізис міофібрил, особливо в навколоядерних зонах (рис. 1, 2). На деяких електронограмах проявлялися ознаки некрозу окремих кардіоміоцитів.

За допомогою електронної мікроскопії на електронограмах шлуночкового міокарда експериментальних тварин визначалися міофібрили різної товщини. При чому деякі з цих структур були в 2-3 рази більші ніж норма. Описані явища можливо пов'язані з впливом етанолу на формування та угруповання білків у товсті та тонкі нитки міофібрил.

На 18-ту добу пренатального розвитку на електронограмах КМЦ експериментальних тварин чітко спостерігалися дистрофічні та деструктивні прояви у кардіоміоцитах. Поряд з міофібрилами, які не відрізнялись за структурою від нормальнофункціонуючих, виділялись великі клі-

тини зі значними змінами. Дистрофічні і деструктивні процеси проявлялись у частковому лізису міофібрилярних компонентів (рис. 3).

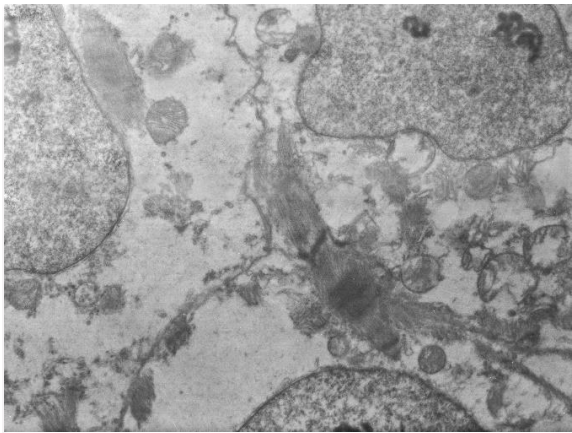


Рис. 1. Міокард щура експериментальної групи на 16-у добу пренатального розвитку. Електронорама. $\times 6000$.

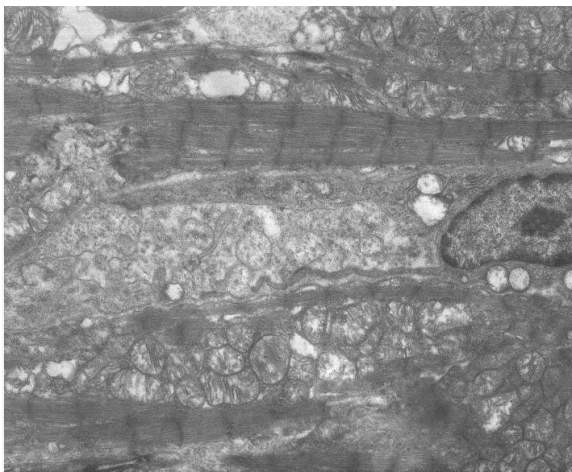


Рис. 2. Міокард щура експериментальної групи на 16-у добу пренатального розвитку. Електронорама. $\times 5000$.

У тих ділянках серця, де розчинення скоротливих структур було більш вираженим, міофібрили спостерігались у вигляді залишків, в яких не виявлені А- та І-диски. У таких міофібрил визначались лише окремі Z-диски. Поступовий лізис призводив до того, що простір, де немає міофібрил заповнюється гранулами і численними мітохондріями (рис. 4).

Дане явище, можливо було пов'язано, з компенсаторними механізмами викликаними дією етанолу на компоненти кардіоміоцитів. Збільшення кількості мітохондрій, на нашу думку, пов'язано з гіпертрофією органу і більшої необхідністю кількості АТФ для функціонування серцевої м'язової тканини. Однак, мітохондрії були дефектні, їх мембрани втрачали свою цілісність, кількість крист зменшувалось. Таким чином,

серце не мало можливість нормально скорочуватись, що призводило до летальних випадків. Під час експериментального дослідження 20% щурів через деякий час після народження вмирали.

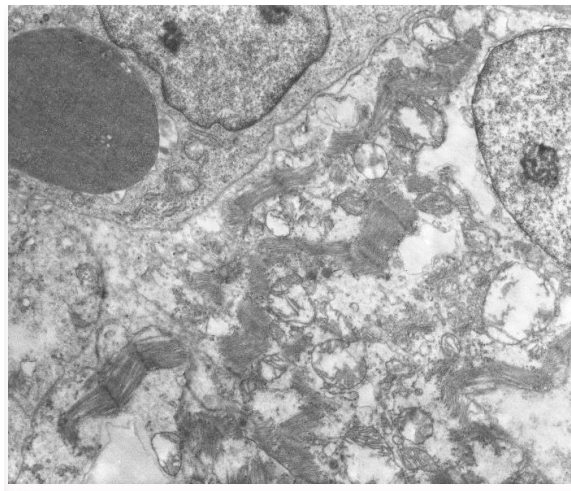


Рис. 3. Міокард щура експериментальної групи на 18-у добу пренатального розвитку. Лізис міофібрил. Електронорама $\times 5000$.

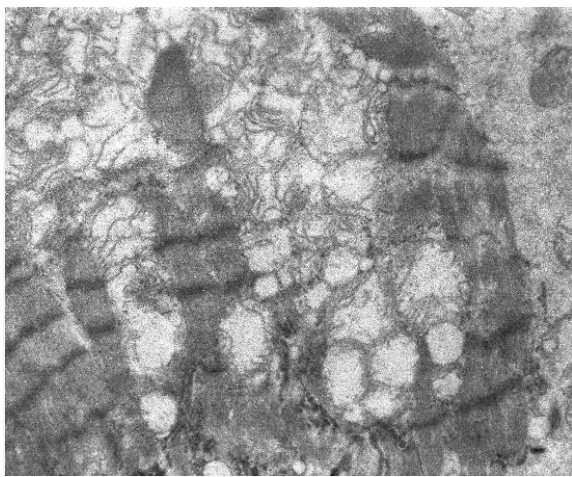


Рис. 4. Міокард щура експериментальної групи на 18-у добу пренатального розвитку. Заповнення простору мітохондріями. Електронорама. $\times 8000$.

Окрім міофібрил, значних змін зазнавали і інші компоненти скоротливого апарату, а саме елементи саркоплазматичного ретикулуму. Спостерігалось розширення цистерн саркоплазматичного ретикулуму, а в деяких випадках їх повна деструкція. Що в свою чергу впливало на вивільнення кальцію з цистерн при механізмі скорочення.

На багатьох електронорамах структура компонентів міофібрил була нечіткою і деякі з них втрачали свою посмугованість. Також, багато з цих клітин перебувала в розслабленому стані. Однак, зустрічались ділянки "перескорочення" саркомерів.

На 20-ту добу ембріогенезу міофібрили, як і всі органи кардіоміоцитів також мали «аномальну» будову. Залучення окремих міофібрил у патологічний процес відбувалось асинхронно. На більш пізніх етапах розвитку спостерігалось наростання деструктивних змін.

Так алкоголізація етанолом у ембріонів експериментальних тварин викликала посилення дистрофічних процесів в КМЦ. Характер морфологічних змін був значно виражений.

На електронограмах шлуночкових кардіоміоцитів, на 20-ту добу, відмічались поряд з клітинами, які мали нормальну ультраструктуру, КМЦ зі значними змінами. У деяких з цих клітин спостерігалось лише часткове порушення поперечної посмугованості. Але поряд з такими клітинами ми могли спостерігати кардіоміоцити у яких посмугованість і зовсім не визначалась та відбувався розпад міофібрил на дрібні точкові фрагменти (рис. 5).

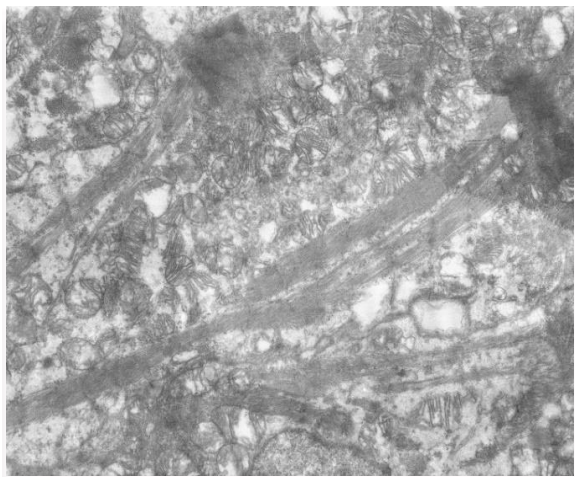


Рис. 5. Міокард щура експериментальної групи на 20-у добу пренатального розвитку. Електронограма. $\times 5000$.

У міофібрилах виявлялися ділянки просвітлення, обумовлені розходженням їх структурних компонентів. У зонах набряку чіткість малюнка деяких із них послаблювалась, міофіламенти в них проявлялись менш чітко (рис. 6).

Перш за все, етанол спричиняв порушення структури актинових та міозинових волокон та їх частковий розрив. Розрив відбувається у ділянках Z-дисків, А- та І- дисків. При цьому структури А- та І-дисків були виявлені не чітко, а на деяких електронограмах зовсім відсутні. Це явище також стосувалося і Z-лінії, яка на деяких міофібрилах ставала менш вираженою, а у деяких випадках зовсім зникала. Простір між вставними дисками розширюється, внаслідок чого відзначається порушення з'єднань кардіоміоцитів, що може впливати на здатність проводити нервовий імпульс (рис. 7).

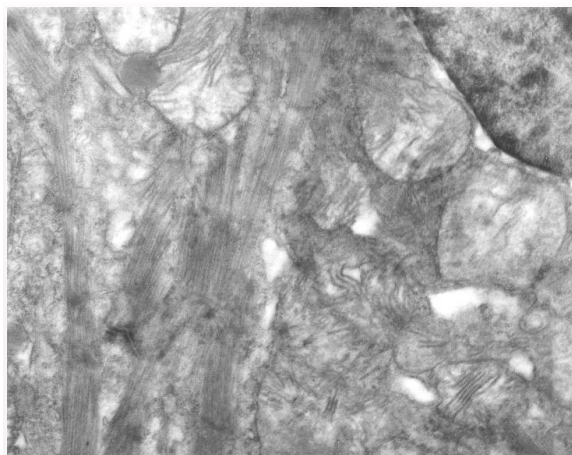


Рис. 6. Міокард щура експериментальної групи на 20-у добу пренатального розвитку. Електронограма. $\times 5000$.

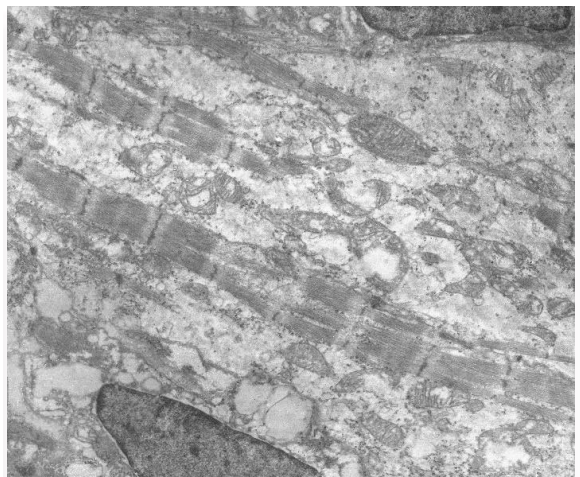


Рис. 7. Міокард щура експериментальної групи на 20-у добу пренатального розвитку. Електронограма. $\times 5000$.

Ультраструктура саркомерів, після дії етанолу на міокард шлуночків щурів, значно порушена у ділянках телофрагми і супроводжувалось значним зниженням скоротливої функції кардіоміоцитів. За нашими даними, це явище можливо тому, що етанол перш за все впливав на α -актинін, що входить до складу телофрагми (рис. 8).

Як і на 18-у добу, на 20-у добу ембріогенезу у КМЦ шлуночків спостерігались значні зміни у елементах L- та T-системі. На електронограмі чітко видно, що цистерни саркоплазматичного ретикулуму були розширені та займали значний простір у саркоплазмі. На нашу думку, дане явище пов'язано з змінами вивільнення та надходження кальцію.

Підсумок

Отже, проведене електронно-мікроскопічне дослідження встановило, що хронічна алкоголь-

на інтоксикація, спричиняла неспецифічні якісні зміни в усіх структурних компонентах шлуночкового міокарда серця – міофібрилах, Т-системі, мітохондріях, тим самим руйнувала їх і викликала незворотні наслідки, які призводили до порушень у роботі серця.

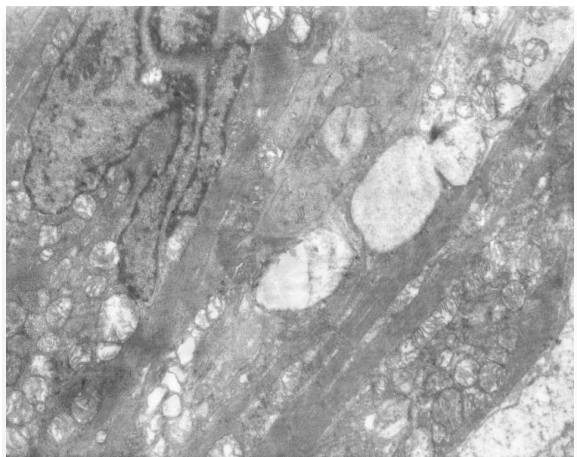


Рис. 8. Міокард щура експериментальної групи на 20-у добу пренатального розвитку. Електроннограма. $\times 5000$.

У багатьох частинах серця визначались дефектні міофібрили, які складались з невеликих

блоків одного або двох саркомерів. Стоншення, лізис та розволокнення міофібрил, свідчили про вплив етанолу на головні скоротливі компоненти – актин та міозин. Зміна форми, будови мітохондрій та елементів Т- та L-систем свідчили про зміну проникності мембрани цих компонентів та порушення відповідних функцій. Алкогольна інтоксикація викликала виражені ознаки гіпертермії і гіперплазії внутрішньоклітинних структур, що вказувало на впровадження пристосувально-захисних механізмів. Таким чином пошкоджуючи основні елементи скоротливого апарату КМЦ етанол спричиняв порушення скорочення серцевої м'язової тканини.

Перспективи подальших досліджень

На наступному етапі роботи заплановано дослідити наслідки пренатальної етанолової інтоксикації на ультраструктуру скоротливого апарату кардіоміоцитів щурів після народження.

Інформація про конфлікт інтересів

Потенційних або явних конфліктів інтересів, що пов'язані з цим рукописом, на момент публікації не існує та не передбачається.

Джерела фінансування

Дослідження проведено в рамках науково-дослідної роботи «Гістогенез компонентів серцево-судинної системи людини та лабораторних тварин у нормі та за умов експерименту» (номер державної реєстрації 0118U004730).

Літературні джерела References

1. Allwork SP. Heart Muscle: Ultrastructural Studies. *J Anat.* 1988;159:200–206.
2. Du A, Sanger JM, Sanger JW. Cardiac myofibrillogenesis inside intact embryonic hearts. *Developmental Biology.* 2008;318:236–246.
3. Ehler E, Gautel M. The sarcomere and sarcomerogenesis. *Adv Exp Med Biol.* 2008;642:3–14.
4. White J, Wang J, Fan Y, Dube D, Sanger JW, Sanger JM. Myofibril Assembly in Cultured Mouse Neonatal Cardiomyocytes. *Anat Rec (Hoboken).* 2018;301(12):2067-2079.
5. Sanger JW, Kang S, Siebrands CC. How to build a myofibril. *Journal of Muscle Research and Cell Motility.* 2005;26(6):343–354.
6. Sanger JW, Kang S, Siebrands CC. How to build a myofibril. *Journal of Muscle Research and Cell Motility.* 2005;26(6):343–354.
7. Mironov AA, Komissarchik YuYa, Mironov VA. *Metody elektronnoy mikroskopii v biologii i meditsine: Metodicheskoe rukovodstvo. [Electron microscopy methods in biology and medicine : Methodological Guide]. St. Petersburg: Science; 1994. 400 p. Russian.*
8. Morimoto S. Sarcomeric proteins and inherited cardiomyocytes. *Cardiovascular Research.* 2008;77:659–666.
9. Sanger JW, Wang J, Fan Y, White J, Mi-Mi L, Dube DK, Pruyne D. Assembly and maintenance OF myofibrils in striated muscle. *The Actin Cytoskeleton.* 2016;3(1):39–75.
10. Hedrich HJ. *The Laboratory Mouse. Second Edition. London: Academic Press; 2012. 845 p.*
11. Du A, Sanger JM, Sanger JW. Cardiac myofibrillogenesis inside intact embryonic hearts. *Developmental Biology.* 2008;318:236–246.
12. Kuo J. *Electron microscopy: methods and protocols. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc; 2007. 608 p.*

Марченко Д.Г., Черкас О.А. Якісні перебудови в ультраструктурі міокарда ембріонів щурів протягом 16-20-ї доби пренатального розвитку у нормі та після дії етанолу.

РЕФЕРАТ. Актуальність. Порушення формування компонентів серцево-судинної системи ще у ембріональному періоді може бути викликано різними ендо- та екзогенними факторами, що у подальшо-

му можуть призводити як до розвитку вад серця, так і до летальних випадків. Тому на теперішній час за допомогою багатьох дослідницьких робіт щодо механізму міофібрилогенезу у кардіоміоцитах (КМЦ) увагу дослідників привернуло питання про основні зміни, які відбуваються у структурі основних елементів скоротливого апарату під впливом різних тератогенних факторів. Використання потужного комплексу методів дослідження у розкритті даного питання обумовили значні дослідження у аналізі цієї теми. **Метою** дослідження було порівняти зміни в ультраструктурі скоротливого апарату кардіоміоцитів щурів, протягом пізніх етапів пренатального розвитку під час нормальному розвитку та після тератогенної дії етанолу. **Результати та підсумок.** Стаття присвячена аналізу змін ультраструктури шлуночкового міокарду ембріонів щурів на протязі пізнього пренатального розвитку. Для даного дослідження використовувалися електронно-мікроскопічні методи з подальшим аналізом електронограм. Результати досліджень свідчать про те, що алкогольна інтоксикація призводить до деструктивних змін у структурі скоротливого апарату кардіоміоцитів (КМЦ) протягом всього розвитку ембріонів щурів. На електронних мікрофотографіях виявлені основні зміни в ультраструктурі А- та І-дисків міофібрил, порушення цілісності саркомерів, зміни форми вставних дисків та Z-диска. В даній статті також звернена увага на зміни в будові елементів тріади, мітохондрій як у нормі, так і після впливу етанолу.

Ключові слова: етанол, міокард, міофібрили, мітохондрії, скоротливий апарат, Т-система.

В.В. Рахманов
І.С. Шпонька




Дніпровський державний
медичний університет,
Дніпро

Надійшла: 24.10.2022
Прийнята: 15.12.2022

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2022.4.19-25>

УДК: 616.321-006-036.4:575.21

ДОСЛІДЖЕННЯ ЕКСПРЕСІЇ ОНКОПРО- ТЕЇНУ p53 ТА EGFR В ПЛОСКОКЛІТИН- НИХ КАРЦИНОМАХ РОТОГЛОТКИ З ПОЗИТИВНИМ І НЕГАТИВНИМ p16 СТАТУСОМ

Rakhmanov V.V.  , Shponka I.S.  Study of p53 and EGFR oncoprotein expression in oropharyngeal squamous cell carcinomas with positive and negative p16 status. Dnipro State Medical University, Dnipro, Ukraine.


ABSTRACT. Background. Squamous cell carcinoma is the most common variant of oropharyngeal cancer, including such sites as the root of the tongue, tonsils, and adenoids. One of the main changes in the WHO classification of head and neck tumors in 2017 is the recognition of the oropharynx as an independent subsite, due to the significant distribution of high oncogenic risk human papillomavirus-related squamous cell carcinomas in this location. The risk group consists of white men over 40 years of age with a high social status, and the incidence of oropharyngeal squamous cell cancer increases with age. **The aim** of the study was to compare the expression levels of p53 and EGFR markers in HPV-positive (p16+) and HPV-negative (p16-) squamous cell carcinomas of the oropharynx (oropharyngeal carcinomas). **Methods.** In the work, the biopsy and surgical material of squamous cell carcinomas of 50 patients (16 women and 34 men) who were treated at the Dnipropetrovsk Regional Clinical Hospital named after I.I. Mechnikova Hospital of Dnipro in the period from 2019 to 2021. The age of the patients ranged from 41 to 80 years; the average age was 58.56±9.75 years. Primary monoclonal antibodies to p16 (RTU), p53 (RTU), EGFR (RTU) and the UltraVision Quanto imaging system (LabVision) were used for immunohistochemical examination. **Results and conclusion.** The positive status of oncoprotein p16 / HPV (+) showed a statistically significant increase in occurrence in samples of squamous cell carcinomas of the oropharynx among women (p<0.05) and in the age group of patients 50-59 years old (p<0.05); in addition, all p16 / HPV (+) oropharyngeal squamous cell carcinoma samples had p53 expression below the 25% threshold. The analysis of p53 oncoprotein expression revealed a reverse trend to p16, the largest number of cases of oropharyngeal squamous cell carcinomas with p53≥25% were found among men (p<0.05) and in the age group of patients 60-69 years old (p<0.05). The highest number of cases of EGFR expression with a high score (2+,3+) was noted among men (p<0.05) and in oropharyngeal squamous cell carcinomas with p53≥25% expression (p<0.05). **Key words:** squamous cell carcinoma, p16, HPV, p53, EGFR.


Citation:

Rakhmanov VV, Shponka IS. [Study of p53 and EGFR oncoprotein expression in oropharyngeal squamous cell carcinomas with positive and negative p16 status]. Morphologia. 2022;16(4):19-25. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2022.4.19-25>

 Rakhmanov V.V. 0000-0003-3200-6039

 Shponka I.S. 0000-0002-3133-8413

 grimm417@gmail.com

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Вступ

Плоскоклітинний рак (ПР) є найбільш поширеним варіантом раку ротоглотки (РГ), що включає такі локалізації як коріння язика, мигдалики та аденоїди [1-4]. Рак глотки (C09-C14), за оцінками Національного канцер реєстру України, на 2020 рік мав 2065 нових випадків і 1449 смертей, що посіло для чоловіків 10 місце за показником захворюваності (питома вага 3,4%) і 9 місце за показником смертності (питома вага 3,6%) [5]. На 100 тис. населення за областя-

ми України визначились регіони найбільшого поширення РГ в Чернігівській (9,1), Житомирській (7,7) і Закарпатських (7,7) областях. Аналіз випадків смертності на 100 тис. населення за областями України показав для РГ найвищі показники в Хмельницькій (6,5), Чернігівській (6,3) і Сумській (5,9) областях [5].

За даними звіту Всесвітньої організації охорони здоров'я, РГ у країнах, що розвиваються, є шостим за поширеністю раком у чоловіків і десятим найпоширенішим раком у жінок [6]. Однією

з головних змін у WHO класифікації пухлин голови та шиї 2017 року є визнання ротоглотки як самостійного субсайту, через значне поширення в цій ділянці плоскоклітинних карцином, пов'язаних з вірусом папіломи людини (ВПЛ) високого онкогенного ризику [7]. Незважаючи на прогрес у діагностичних методиках, ПР РГ має високу захворюваність у багатьох частинах світу, включаючи Азію та Західну Європу. Групу ризику складають білі чоловіки старше 40 років з доволі високим соціальним статусом, і з віком захворюваність ПР РГ збільшується [2, 8-10].

Незважаючи на широкі знання про патогенез і нові підходи до діагностики ПР РГ, лікування їх залишається незадоволеним у більшості пацієнтів [7-9]. ВПЛ високого ризику є важливим етіологічним фактором у ротоглотці і вважається причиною зростання захворюваності на цей тип раку, особливо серед молодших пацієнтів. Вважається, що ВПЛ-позитивний ПР РГ зазвичай має більш сприятливий прогноз, ніж ВПЛ-негативний ПР РГ [9-11]. Така етіологічна неоднорідність проявляється на генетичному/геномному, епідеміологічному та клінічному рівнях. Тютюн і алкоголь залишаються основними етіологічними факторами раку ротової порожнини, тоді як ВПЛ є основною причиною раку ротоглотки. Таким чином, боротьба з тютюном і алкоголем і профілактична вакцинація проти ВПЛ залишаються найбільш перспективними засобами профілактики раку ротової порожнини і ротоглотки на даний момент [11-12]. Важливо, що постійно з'являються альтернативні тютюнові вироби, такі як бездимний тютюн/снус, кальян і кальян, електронні сигарети, ароматизовані сигари та сигарилли, а також вироби, що розчиняються в ротовій порожнині, становлять ключову проблему для громадського здоров'я, а канцерогенний вплив цих продуктів залишається активна область дослідження [1, 7-9].

p16^{INK4a} (CDKN2A) є інгібітором циклін-залежної кінази, який пригнічує фосфорилування pRb і блокує прогресування клітинного циклу в контрольній точці G1 до S. Втрата експресії p16 через делецію, мутацію або гіперметилоування є поширеними при ПР голови та шиї. Однак функціональна інактивация pRb білком E7 ВПЛ призводить до надмірної експресії p16^{INK4a}, що робить його сурогатним маркером для ВПЛ. Подібним чином, білок ВПЛ E6 може інактивувати p53; таким чином, спостерігається нижча частота мутацій p53 у ВПЛ-позитивних пухлинах [8-13].

Аномальна функція рецептора епідермального фактора росту EGFR впливає на прогресування клітинного циклу, апоптозу, ангиогенезу, мобільності пухлинних клітин і метастазів і корелює з поганим прогнозом при ПР голови та шиї. Дослідження Singla S. et al. (2018) показу-

ють високу експресію EGFR пухлин та асоціацію з нижчою виживаністю у випадках ПР голови та шиї [14], тоді як інші дослідження не виявили кореляції між експресією EGFR і виживанням пацієнтів [15-16].

Онкопротеїн p53 часто мутує, надмірно експресується у ПР голови та шиї різних локалізацій та пов'язаний з поганим прогнозом [8-10]. Таким чином, залишаються суперечки щодо прогностичного значення p53 та EGFR в ПР ротоглотки, а тим більше в залежності від ВПЛ статусу.

Метою дослідження було порівняти рівні експресії маркерів p53 та EGFR в ВПЛ-позитивних (p16+) та ВПЛ-негативних (p16-) плоскоклітинних карциномах ротоглотки (орофарингеальних карциномах).

Матеріали та методи

В роботі досліджено біопсійний та операційний матеріал плоскоклітинних карцином 50 пацієнтів (16 жінок і 34 чоловіків), що проходили лікування в КП «Дніпропетровська обласна клінічна лікарня ім. І.І. Мечникова» ДОР м. Дніпра в період з 2019 по 2021 рр. Вік пацієнтів коливався в діапазоні 41 – 80 років, середній вік склав 58,56±9,75 років. Дослідження проведено згідно з письмовою згодою учасників і відповідно до принципів біоетики, викладених у Гельсінській декларації «Етичні принципи медичних досліджень за участю людей» та «Загальній декларації про біоетику та права людини (ЮНЕСКО)».

За гістологічною будовою всі спостереження були представлені плоскоклітинною карциномою. Також гістологічний матеріал ПР РГ був розподілений на групи в залежності від наявності метастазів та рецидивів: ПР без метастазів 27 (54,00) та ПР з метастазами 23 (46,00%); ПР без рецидивів 46 (92,00) та ПР з рецидивом 4 (8,00%).

Морфологічний метод. Зразки пухлин ПР РГ фіксованих у формаліні і залиті парафіном були взяті з архіву КЗ «Дніпровське обласне патологоанатомічне бюро». Парафінові зрізи 4-5мм були отримані на мікротомі Microm HM-340 і забарвлені за стандартною методикою гематоксиліном й еозином. За внутрішній контроль приймали багатошаровий плоский епітелій, що потрапляв в зріз поруч з плоскоклітинною карциномою. Мікроскопія проводилась за допомогою світлового мікроскопу ZEISS "Primo Star" (об'єктиви ×10, ×20, ×40). Цифрові зображення були отримані камерою мікроскопу Zeiss Primo Star - AxioCam ERC 5s з ліцензованим програмним забезпеченням ZEN 2 blue edition [17].

Імуногістохімічний метод. Парафінові зрізи наносили на адгезивні предметні скельця SuperFrost Plus. Після депарафінізації, регідратації, температурного демаскування антигенів та пригнічення активності ендогенної пероксидази, проводили інкубацію зрізів з первинними ан-

титілами у вологих камерах при температурі 23 – 25°C на протязі 30 хвилин. Використовувались первинні моноклональні антитіла до p16 (RTU), p53 (RTU), EGFR (RTU) та система візуалізації UltraVision Quanto, (LabVision). Для ідентифікації реакції наносився розчин хромогену 3-діамінобензидин тетрахлориду (Quanto, LabVision) під контролем мікроскопу протягом від 20 секунд до 3 хвилин, з проявом у вигляді коричневого забарвлення. Ядра додатково за-

барвлювали гематоксином Майєра протягом 1-3 хвилини [18].

Оцінка імуногістохімічного забарвлення. За рекомендаціями Chrystiano de C. Ferreira et al. (2021) [1], експресія маркера p16, що була розцінена нами як еквівалент позитивності ПР РГ на ВПЛ, вважалась позитивною тільки якщо демонструвала сильне дифузне ядерно-цитоплазматичне забарвлення в більше ніж 75% клітин (рис. 1 (А-Б)).

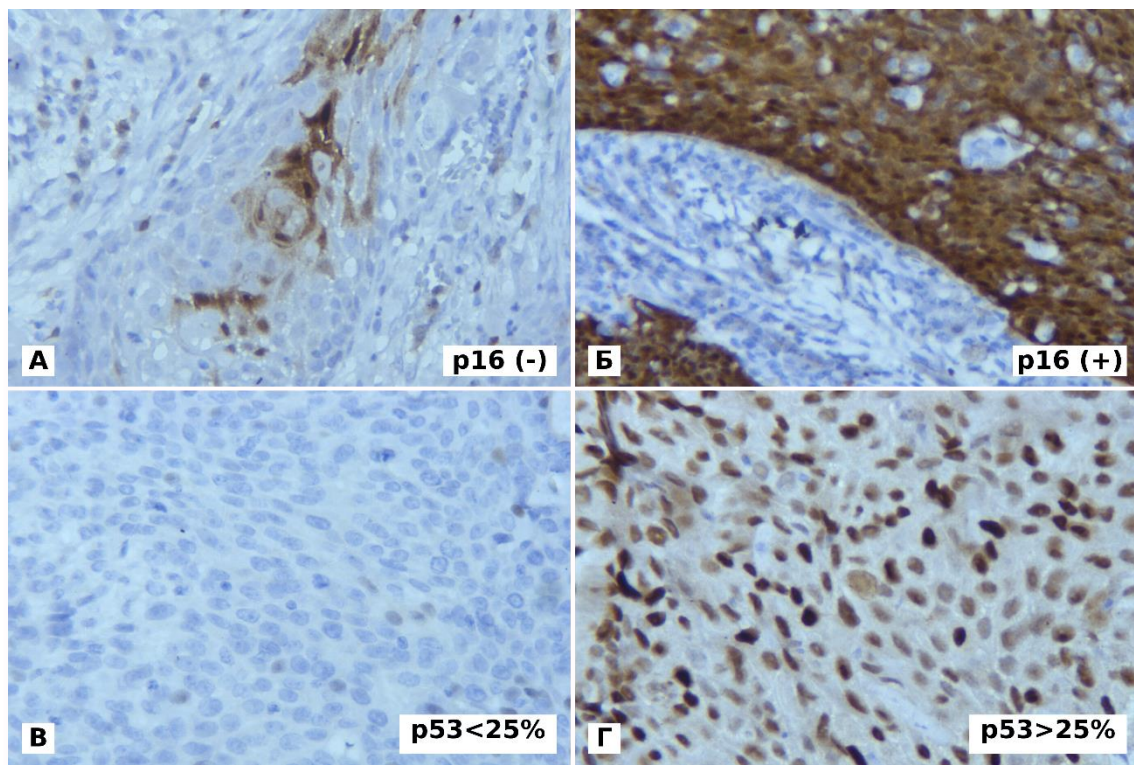


Рис. 1. Плоскоклітинний рак ротоглотки, імуногістохімічний метод забарвлення з гематоксином Майєра (×400). А. Негативна експресія маркера p16 (ядерне, ядерно-цитоплазматичне забарвлення поодиноких клітин). Б. Позитивна експресія маркера p16 (сильне дифузне ядерно-цитоплазматичне забарвлення в більше ніж 75% клітин). В. Інтрануклеарна експресія p53 на рівні 1,5% (дикий тип). Г. Інтрануклеарна експресія p53 на рівні 80% (мутантний тип).

Експресія маркера p53 вважалась позитивною, якщо щонайменше або більше 25% пухлинних клітин демонстрували ядерну експресію маркера (рис. 1 В-Г), за рекомендаціями Plath M. et al. (2018) [12].

Фарбування на EGFR вважалось позитивним, якщо щонайменше 10% або більше пухлинних клітин виявляли мембранну експресію маркера зі слабкою до помірної або сильною інтенсивністю фарбування. Інтенсивність EGFR оцінювали за шкалою від 1 до 3, де 1 = слабе, 2 = помірне і 3 = сильне однорідне або нерівне фарбування (рис. 2), за рекомендаціями Mohanapure N. S. et al. (2022) [16].

Статистичний аналіз даних проводили в програмному середовищі R version 3.4.1 (2017-06-30) -- "Single Candle" Copyright (C) 2017; The R Foundation for Statistical Computing Platform:

x86_64-w64-mingw32/x64 (64-bit), що поширюється безкоштовно за ліцензією GNU General Public License.

Встановлення достовірності міжгрупових зв'язків за кількісним розподілом проводилось за допомогою точного тесту Фішера. Для всіх критеріїв відмінності вважали достовірними при $p < 0,05$ [19].

Результати та їх обговорення

Дослідження особливостей експресії онкопротеїну p16 (як маркера етіологічного впливу ВПЛ інфекції) в ПР ділянок ротоглотки (орофарингеальної області) продемонструвало розподіл на більшість p16 (-) / (ВПЛ негативних) зразків 30 з 50 (60,0%) та меншість p16 (+) / (ВПЛ позитивних) - 20 з 50 (40,0%). Співвідношення чоловіків і жінок в p16/ВПЛ (-) ПР РГ та p16 (+) ПР РГ виявилось статистично достовірно

відмінним: у p16/ВПЛ (-) ПР РГ 25 чоловіків (83,33 %) та 5 жінок (16,67%), порівняно з p16/ВПЛ (+) ПР РГ, де було 9 чоловіків (45,00%) і 11 жінок (55,00%), ($p < 0,05$). Аналіз контингенту за віковими групами показав найбільшу кількість p16/ВПЛ (-) ПР РГ в віці 60-69 років - 12 з 30 (40,0%), в той час як найбільша кількість

p16/ВПЛ (+) ПР РГ припала на молодший вік 50-59 років - 10 з 20 (50,0%), ($p < 0,05$). Середній вік пацієнтів з p16/ВПЛ (-) ПР РГ склав $60,4 \pm 9,39$ років, в той час як середній вік пацієнтів з p16/ВПЛ (+) ПР РГ виявився на п'ять років молодшим - $55,8 \pm 9,87$ років.

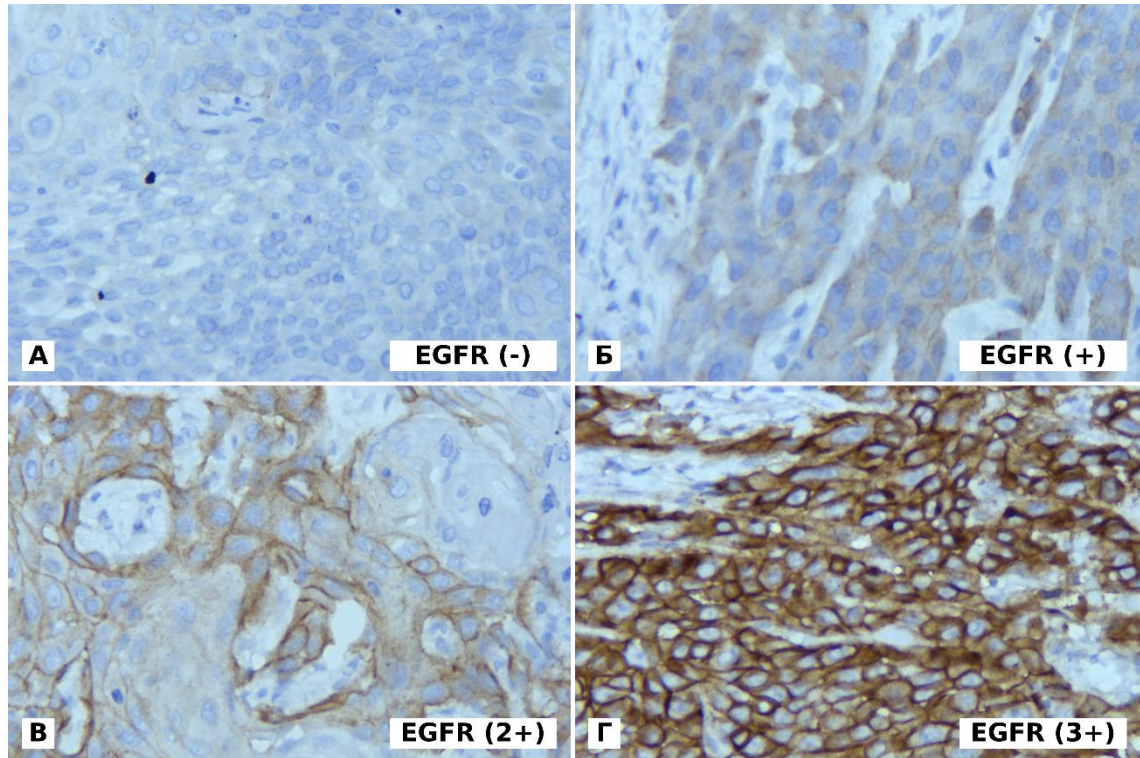


Рис. 2. Варіанти експресії маркера EGFR в плоскоклітинних карциномах ротоглотки, імуногістохімічний метод забарвлення з гематоксином Майєра ($\times 400$). А. Score експресії 0 (-): менше 10% пухлинних клітин виявляли мембранну експресію маркера EGFR вважалось позитивним. Б. Score експресії 1+: більше 10% пухлинних клітин виявляли мембранну експресію маркера EGFR слабкої інтенсивності. В. 25-50% мічених мембран пухлинних клітин високої інтенсивності (2). Б. Score експресії 2+: >10% мічених мембран пухлинних клітин помірної інтенсивності. Г. Score експресії 3+: >10% мічених мембран пухлинних клітин високої інтенсивності.

Але не дивлячись на дані Wang H et al. (2020) про більш «доброякісний» перебіг p16/ВПЛ (+) ПР РГ [3], в нашому дослідженні кількість випадків p16/ВПЛ (+) ПР РГ з метастазами з'ясувалась більшою ніж в ПР РГ p16/ВПЛ (-) - 8 з 20 (40,0%) проти 10 з 30 (33,33%), відповідно, але статистично вірогідної різниці за точним тестом Фішера знайдено не було ($p > 0,05$). Випадків ПР РГ з рецидивами серед p16/ВПЛ (+) пацієнтів також було більше ніж серед p16/ВПЛ (-) - 1 з 20 (5,0%) порівняно з 3 з 30 (1,0%), відповідно, ($p > 0,05$).

Цікавим виявився аналіз розподілу варіантів експресії онкопротеїну p53 в ПР РГ в залежності від наявності / відсутності p16 /ВПЛ, а саме, всі p16/ВПЛ (+) зразки ПР РГ (20 з 20; 100%) мали експресію p53 нижче 25% порогового значення, що підтверджує різницю в походженні p16 (+) /p53 (-) та p16 (-) /p53 (+) ПР РГ через етіологічний вплив ВПЛ та тютюну / алкоголю,

відповідно, що активно просувається в дослідженнях багатьох авторів [1-4,9-12]. Дані розподілу варіантів експресії p53 за клініко-морфологічними характеристиками плоскоклітинних карцином ротоглотки занесені в таблицю 1.

Варіанти експресії EGFR (0, 1+, 2+, 3+) в p16/ВПЛ (-) та p16/ВПЛ (+) ПР РГ для зручності статистичного обліку були об'єднані в 2 групи низький score (EGFR 0,+1) та високий score (EGFR +2,+3) (табл. 2). Кількість p16/ВПЛ (-) та p16/ВПЛ (+) зразків ПР РГ, що мали експресію маркера EGFR на рівні 2+/3+, виявилась майже однаковою - 23 з 30 (76,67%) порівняно з 14 з 20 (70,00%), відповідно, ($p > 0,05$). Що говорить про вірогідну незалежність цього патогенетичного шляху розвитку ПР орофарингеальної ділянки від ВПЛ інфекції. Такі думки висловлюють і інші автори, що мають подібні результати своїх досліджень [14,16]. Дані розподілу варіантів

експресії EGFR за клініко-морфологічними характеристиками плоскоклітинних карцином ротоглотки занесені в таблицю 2.

Аналізуючи експресію онкопротеїну p53 в плоскоклітинних карциномах орофарингеальної області, треба зазначити, що серед чоловіків p53 \geq 25% зразків ПР РГ виявилось статистично

достовірно більше ніж серед жінок (p<0,05), (табл. 1). Також різниця за експресією p53 була знайдена в вікових підгрупах пацієнтів: найбільша кількість випадків ПР РГ з p53<25% виявилась в підгрупі 50-59 років, в той час як більшість пацієнтів з ПР РГ з p53 \geq 25% припала на 60-69 років, (p<0,05), (табл. 1)

Таблиця 1
Розподіл варіантів експресії p53 за клініко-морфологічними характеристиками плоскоклітинних карцином ротоглотки

Клініко-морфологічна характеристика	n (%) n=50, (%)	Варіант експресії p53	
		p53<25% n=38, (%)	p53 \geq 25% n=12, (%)
Чоловіки	34 (68,00)	24 (63,16)	10 (83,33)
Жінки	16 (32,00)	14 (36,84)	2 (16,67)
p		p<0,05	
Вік (роки) 40-49	10 (20,00)	9 (23,68)	1 (8,33)
50-59	18 (36,00)	15 (39,47)	3 (25,00)
60-69	15 (30,00)	9 (23,68)	6 (50,00)
70-80	7 (14,00)	5 (13,16)	2 (16,67)
p		p<0,05	
p16 / ВПЛ (-)	30 (60,00)	18 (47,37)	12 (100,00)
p16 / ВПЛ (+)	20 (40,00)	20 (52,63)	0 (0,00)
p		p*	
Без метастазів	27 (54,00)	19 (50,00)	8 (66,67)
З метастазами	23 (46,00)	19 (50,00)	4 (33,33)
p		p>0,05	
Без рецидиву	46 (92,00)	35 (92,10)	11 (91,67)
З рецидивом	4 (8,00)	3 (7,90)	1 (8,33)
p		p>0,05	

Примітка: p – встановлення достовірності міжгрупових зв'язків за кількісним розподілом проводився точним тестом Фішера, p* - статистичний аналіз даних не проводився через відсутність зразків в деяких підгрупах, відмінність вважали достовірною при p<0,05.

Досліджуючи експресію маркеру EGFR в плоскоклітинних карциномах ротоглотки виявилось, що серед чоловіків випадків ПР РГ з високим score EGFR (+2, +3) виявилось статистично достовірно більше ніж серед жінок (p<0,05), (табл. 2). Також різниця за експресією EGFR була знайдена в підгрупах пацієнтів з різною експресією онкомаркеру p53: в підгрупі ПР РГ з p53<25% виявилась більшість ПР РГ з низьким score EGFR (0, +1) 11 з 13 (84,62%), і навпаки, в підгрупі ПР РГ з p53 \geq 25% виявилась більшість випадків ПР РГ з p53 \geq 25% 35 з 37 (94,59%), (p<0,05), (табл. 2).

Висновки

Позитивний статус за онкопротеїном p16 / ВПЛ (+) показав статистично достовірне збільшення зустрічності в зразках плоскоклітинних карцином ротоглотки серед жінок (p<0,05) та в віковій групі пацієнтів 50-59 років (p<0,05); до того ж всі p16 / ВПЛ (+) зразки плоскоклітинних карцином ротоглотки мали експресію p53 нижче 25% порогового значення.

Аналіз експресії онкопротеїну p53 виявив

зворотну до p16 тенденцію, найбільша кількість випадків плоскоклітинних карцином ротоглотки з p53 \geq 25% виявилась серед чоловіків (p<0,05) та в віковій групі пацієнтів 60-69 років (p<0,05);

Найбільша кількість випадків експресії EGFR з високим score (2+,3+) відмічалась серед чоловіків (p<0,05) та в плоскоклітинних карциномах ротоглотки з експресією p53 \geq 25% (p<0,05).

Перспективи подальших досліджень

Планується дослідити особливості експресії цитокератинів різних груп в залежності від клініко-морфологічних характеристик та проліферативної активності орофарингеальних плоскоклітинних карцином.

Інформація про конфлікт інтересів

Потенційних або явних конфліктів інтересів, що пов'язані з цим рукописом, на момент публікації не існує та не передбачається.

Розподіл варіантів експресії EGFR за клініко-морфологічними характеристиками плоскоклітинних карцином ротоглотки

Клініко-морфологічна характеристика	n (%) n=50	Варіант експресії EGFR	
		Score EGFR 0,+1 низький, n=13	Score EGFR +2, +3 високий, n=37
Чоловіки	34 (68,00)	7 (53,85)	27 (72,97)
Жінки	16 (32,00)	6 (46,15)	10 (27,03)
p		p<0,05	
Вік 40-49	10 (20,00)	3 (23,08)	7 (18,92)
50-59	18 (36,00)	4 (30,77)	14 (37,84)
60-69	15 (30,00)	2 (15,38)	13 (35,13)
70-80	7 (14,00)	4 (30,77)	3 (8,11)
p		p>0,05	
p16 / ВПЛ (-)	30 (60,00)	7 (53,85)	23 (62,16)
p16 / ВПЛ (+)	20 (40,00)	6 (46,15)	14 (37,84)
p		p>0,05	
Без метастазів	27 (54,00)	6 (46,15)	21 (56,76)
З метастазами	23 (46,00)	7 (53,85)	16 (43,24)
p		p>0,05	
Без рецидиву	46 (92,00)	11 (84,62)	35 (94,59)
З рецидивом	4 (8,00)	2 (15,38)	2 (5,41)
p		p>0,05	
p53 <25%	13 (26,00)	11 (84,62)	2 (5,41)
p53 ≥25%	37 (74,00)	2 (15,38)	35 (94,59)
p		p<0,05	

Примітка: p - встановлення достовірності міжгрупових зв'язків за кількісним розподілом проводився точним тестом Фішера, p* - статистичний аналіз даних не проводився через відсутність зразків в деяких підгрупах, відмінність вважали достовірною при p<0,05.

Літературні джерела References

1. De C Ferreira C, Dufloth R, de Carvalho AC, et al. Correlation of p16 immunohistochemistry with clinical and epidemiological features in oropharyngeal squamous-cell carcinoma. *PLoS One*. 2021;16 (6):e0253418.
2. Sabu A, Ratna Mouli NV, Tejaswini N. Human papillomavirus detection in oropharyngeal squamous cell carcinoma using p16 immunohistochemistry. *International Journal of Applied and Basic Medical Research*. 2019;9(4):212-216. doi: 10.4103/ijabmr.IJABMR_221_18.
3. Huanhuan Wang, Yuyu Zhang, Wei Bai, et al. Feasibility of Immunohistochemical p16 Staining in the Diagnosis of Human Papillomavirus Infection in Patients With Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front. Oncol*. 2020;10:524928. doi: 10.3389/fonc.2020.524928.
4. Orsaria M, Marzinotto S, De Marchi L, et al. HPV-related Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma: p16INK4A Immunohistochemistry or HPV Genotyping. *Anticancer research*. 2015;35: 4733-4740.
5. Fedorenko ZP, Hulak LO, Mykhailovych YuY, et al. [Cancer in Ukraine, 2019-2020. Morbidity, mortality, performance indicators of the oncology service]. *Bulletin of the National Chancery Register of Ukraine*. 2021;22. Ukrainian. http://www.ncru.inf.ua/publications/BULL_22/.
6. World Health Organisation Classification of Head and Neck Tumours, 4th ed. A. K. El-Naggar, J. K. C. Chan, J. R. Grandis, T. Takata, P. J. Slootweg C. D. (Eds.). IARC Press: Lyon, France, 2017. Vol. 9. P. 136-138.
7. Updated WHO nomenclature of head and neck lesions and associated imaging findings. N. Oren, A. Vaysberg, D. T. Ginat. *Insights into Imaging*. 2019. Vol. 10. P. 72. <https://doi.org/10.1186/s13244-019-0760-4>.
8. Shelton J, Purgina BM, Cipriani NA et al. p16 immunohistochemistry in oropharyngeal squamous cell carcinoma: a comparison of antibody clones using patient outcomes and high-risk human papillomavirus RNA status. *Modern Pathology*.

2017;30:1194-1203. doi:10.1038/modpathol.2017.31.

9. Adilbay D, Adilbayev G, Kidirbayeva G, et al. HPV infection and P16 expression in oral and oropharyngeal cancer in Kazakhstan. *Infectious Agents and Cancer*. 2018;13:2. DOI 10.1186/s13027-018-0175-8.

10. Hashmi AA, Younus N, Naz S. p16 Immunohistochemical expression in head and neck squamous cell carcinoma: association with prognostic parameters. *Cureus*. Vol. 12 (6). P. e8601. doi:10.7759/cureus.8601.

11. Nazim Benzerdjeb, Juliet Tantot, Christophe Blanchet, et al. Oropharyngeal squamous cell carcinoma: p16/p53 immunohistochemistry as a strong predictor of HPV tumour status. *Histopathology*. 2021;79(3):381-390. doi: 10.1111/his.14350

12. Michaela Plath, Martina A Broglie, Diana Förbs, et al. Prognostic significance of cell cycle-associated proteins p16, pRB, cyclin D1 and p53 in resected oropharyngeal carcinoma. *J Otolaryngol Head Neck Surg*. 2018;47(1):53. doi: 10.1186/s40463-018-0298-3.

13. Hashmi AA, Hussain ZF, Hashmi SK, et al. Immunohistochemical over expression of p53 in head and neck squamous cell carcinoma: clinical and prognostic significance. *BMC Res Notes*. 2018;11(433):1-5. <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3547-7>.

14. Singla S, Singla G, Zaheer S, et al. Expression of p53, epidermal growth factor receptor, c-erbB2 in oral leukoplakias and oral squamous cell carcinomas. *J Cancer Res Ther*. 2018;14(2):388-393. doi: 10.4103/0973-1482.191027.

15. Kumar B, Cordell KG, Lee JS, et al. EGFR, p16, HPV Titer, Bcl-xL and p53, Sex, and Smoking As Indicators of Response to Therapy and Survival in Oropharyngeal Cancer. *J Clin Oncol*. 2008 Jul 1; 26(19): 3128–3137. doi: 10.1200/JCO.2007.12.7662.

16. Mohanapure NS, Siddhi Gaurish Sinai Khandeparkar, Pradnya B Saragade et al. Immunohistochemical study of epidermal growth factor receptor, human epidermal growth factor receptor 2/neu, p53, and Ki67 in oral squamous cell carcinoma. *JOMFP*. 2022; 26(1):127-128. DOI: 10.4103/jomfp.jomfp_310_21.

17. Vareniuk IM, Dzerzhynskyi ME. [Methods of cyto-histological diagnosis: study guide]. Kyiv. 2019. 256 p. Ukrainian.

18. Nguyen T. *Immunohistochemistry: A Technical Guide to Current Practices*. Cambridge: Cambridge University Press. 2022. 272 p.

19. Strahova OP, Androsov OI. [Statistical methods of processing the results of medical and biological research]. Lviv. 2021. 164 p. Ukrainian.

Рахманов В.В., Шпонька І.С. Дослідження експресії онкопротеїну p53 та EGFR в плоскоклітинних карциномах ротоглотки з позитивним і негативним p16 статусом.

РЕФЕРАТ. Актуальність. Плоскоклітинний рак є найбільш поширеним варіантом раку ротоглотки, що включає такі локалізації як коріння язика, мигдалики та аденоїди. Однією з головних змін у ВООЗ класифікації пухлин голови та шиї 2017 року є визнання ротоглотки (орофарингеальної ділянки) як самостійної одиниці, через значне поширення в цій локалізації плоскоклітинних карцином, пов'язаних з вірусом папіломи людини високого онкогенного ризику. Групу ризику складають білі чоловіки старше 40 років з доволі високим соціальним статусом, і з віком захворюваність на плоскоклітинний рак ротоглотки збільшується. **Метою** дослідження було порівняти рівні експресії маркерів p53 та EGFR в ВПЛ-позитивних (p16+) та ВПЛ-негативних (p16-) плоскоклітинних карциномах ротоглотки (орофарингеальних карциномах). **Методи.** В роботі досліджено біопсійний та операційний матеріал плоскоклітинних карцином 50 пацієнтів (16 жінок і 34 чоловіків), що проходили лікування в КП «Дніпропетровська обласна клінічна лікарня ім. І.І. Мечникова» ДОР м. Дніпра в період з 2019 по 2021 рр. Вік пацієнтів коливався в діапазоні 41 – 80 років, середній вік склав $58,56 \pm 9,75$ років. Для імуногістохімічного дослідження використовувалися первинні моноклональні антитіла до p16 (RTU), p53 (RTU), EGFR (RTU) та система візуалізації UltraVision Quanto, LabVision). **Результати та підсумок.** Позитивний статус за онкопротеїном p16 / ВПЛ (+) показав статистично достовірне збільшення зустрічаємості в зразках плоскоклітинних карцином ротоглотки серед жінок ($p < 0,05$) та в віковій групі пацієнтів 50-59 років ($p < 0,05$); до того ж всі p16 / ВПЛ (+) зразки плоскоклітинних карцином ротоглотки мали експресію p53 нижче 25% порогового значення. Аналіз експресії онкопротеїну p53 виявив зворотну до p16 тенденцію, найбільша кількість випадків плоскоклітинних карцином ротоглотки з $p53 \geq 25\%$ виявились серед чоловіків ($p < 0,05$) та в віковій групі пацієнтів 60-69 років ($p < 0,05$). Найбільша кількість випадків експресії EGFR з високим score (2+,3+) відмічалась серед чоловіків ($p < 0,05$) та в плоскоклітинних карциномах ротоглотки з експресією $p53 \geq 25\%$ ($p < 0,05$).

Ключові слова: плоскоклітинний рак, p16, ВПЛ, p53, EGFR.

В.С. Сухін
Г.І. Грановська
С.В. Данилюк

ДУ «Інститут медичної радіології та онкології ім. С.П. Григор'єва НАМН України», Харків

Надійшла: 24.10.2022

Прийнята: 15.12.2022

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2022.4.26-31>

УДК 618.146-006:616-006

МОРФОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ТЕРАПЕВТИЧНОГО ПАТОМОР- ФОЗУ РАКУ ШИЙКИ МАТКИ ПІС- ЛЯ ПЕРЕДОПЕРАЦІЙНОЇ HDR- БРАХІТЕРАПІЇ

Sukhin V.S.  , Granovska G.I. , Danilyuk S.V.  Morphological features of the therapeutic pathomorphosis of cervical cancer after preoperative HDR-brachytherapy.

State institution «Institute of Medical Radiology and Oncology named after S.P. Grigoriev National Academy of Sciences of Ukraine», Kharkiv, Ukraine.

ABSTRACT. Background. The relevance of the problem of optimization of the treatment programs for cervical cancer patients is due to the lack of rational modes of dose fractionation during the preoperative course of radiation therapy. **The purpose** of our study was to conduct the comparative analysis and evaluate the effectiveness of different doses of preoperative HDR-brachytherapy, according to the investigational data of the therapeutic pathomorphosis of the tumor. **Methods.** There were investigated 50 samples of the cervical carcinoma of patients with stages IB-IIA, obtained during surgery. In this group of patients there was performed preoperative HDR-brachytherapy according to methodic of non-standard dose fractionation of 5+7 Gy (study group). And there were investigated another 20 samples of the tumor tissue of the control group of patients, whom preoperative HDR-brachytherapy was performed according to standard dose fractionation of 5+5 Gy. After brachytherapy all the patients have also obtained external beam radiation therapy (EBRT) with a single dose 2 Gy up to total dose of 20 Gy. The total dose of the preoperative irradiation was 30-32 Gy, depending on the patients' group. The samples, obtained at surgery, were investigated macro- and microscopically, using the standard methods of histological preparation with hematoxylin and eosin staining. There were taken into consideration many morphological signs, such as nature of tumor growth, histological structure, tumor grade, mitotic activity, features of cellular reactions in tumor stroma, presence and degree of dystrophic and regressive changes of neoplasia, presence of necrosis and apoptosis. The main criteria for the quality of preoperative treatment of cervical cancer patients is considered tumor complete regression or regression of >50%, defined in surgical samples. As a **result** of the data analysis, the pathomorphosis grade I-II (regression of <50% of tumor) was observed in both groups: 28,0 % in the 1st group and 70,0 % in the 2nd group. Grade III pathomorphosis (regression of >50%) was detected in 62,0 % of cases in the 1st group and in 30,0 % of cases in the 2nd group. There were only 8,0 % of tumor samples in the 1st study group, where there was detected complete tumor regression (pathomorphosis grade IV). **Conclusion.** The pathomorphosis of grade III and IV, detected in 70,0 % of samples of study group (vs. 30,0 % of samples in the control group) may indicate on the higher effectiveness of the preoperative HDR-brachytherapy, conducted by non-standard dose fractionation of 5+7 Gy in cervical cancer patients stages IB-IIA.

Key words: cervical cancer, HDR-brachytherapy, dose of irradiation, therapeutic pathomorphosis, morphological features.

Citation:

Sukhin VS, Granovska GI, Danilyuk SV. [Morphological features of the therapeutic pathomorphosis of cervical cancer after preoperative HDR-brachytherapy]. Morphologia. 2022;16(4):26-31. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2022.4.26-31>

 Sukhin V.S. 0000-0002-1238-5855

 Granovska G.I. 0000-0002-4403-3707

 Danilyuk S.V. 0000-0002-9971-0410

 suhin_vlad@ukr.net

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Вступ

Захворюваність на рак шийки матки (РШМ) у світі становить 15,2, летальність — 5,8 на 100 тис. жіночого населення. Щороку реєструють понад 300 тис. випадків смерті вна-

слідок цієї патології та близько 500 тис. нових випадків [1-3]. За даними Національного канцер-реєстру України, протягом останніх десяти років спостерігається тенденція росту захворюваності з 17,5 до 19,8 на 100 тис. населення,

летальність – до 8 на 100 тис. Відзначено істотне зростання рівня захворюваності на РШМ серед молодих жінок у віці 20-44 роки, при цьому пік кількості хворих змістився з 59-69 років до вікової групи 45-59 років. Серед жінок працездатного віку РШМ посідає одне з перших місць за смертністю (9,1 на 100 тис. жіночого населення), що є соціальною проблемою і вказує на невирішеність як діагностичних, так і лікувальних задач [4-6].

Відповідно до сучасних стандартів, основним методом у лікуванні місцево-поширеного РШМ ІВ-ІІА стадії визнано хіміо-променевою терапією із наступним хірургічним втручанням в обсязі розширеною екстирпації матки за методом Вертгейма. Такий підхід має ряд теоретичних обґрунтувань. Протипухлинні препарати посилюють променево-ушкодження пухлинних клітин за рахунок порушення механізмів репарації ушкодженої ДНК, синхронізації вступу пухлинних клітин у фази клітинного циклу, найбільш чутливі до променевого ушкодження, зменшення кількості пухлинних клітин, що перебувають у фазі спокою, та здатності вбивати резистентні до опромінювання пухлинні клітини, які знаходяться в стані гіпоксії [7, 8]. Крім зазначеного, самі протипухлинні препарати володіють цитостатичним ефектом не тільки відносно первинної пухлини і регіональних метастазів, але і здатні контролювати наявні віддалені метастази.

Передопераційна променева терапія (ПТ) дозволяє зменшити розміри пухлини, відмежувати її від навколишніх нормальних тканин, що підвищує резектабельність пухлини, створює можливість абластичного оперативного втручання, яке знижує дисемінацію пухлинних клітин, зменшує частоту місцевих рецидивів і віддаленого метастазування та сприяє покращенню результатів лікування [9].

Важливим компонентом ПТ, що забезпечує вплив на первинний осередок, є контактна ПТ. Введення джерела випромінювання до пухлини або порожнини з пухлиною (брахітерапія (БТ)) дозволяє не тільки досягти максимальної точності дозного розподілу але й підвести до пухлини великі дози, порівняно із дистанційним опроміненням, без збільшення ризику променево-ускладнень [10].

Метою нашого дослідження було порівняти ефективність різних доз передопераційної HDR-брахітерапії при РШМ ІВ-ІІА стадії за даними терапевтичного патоморфозу пухлини.

Матеріали та методи

Для морфологічного дослідження зразки операційного матеріалу пацієнток із РШМ стадій ІВ-ІІА [11] було розподілено на дві групи згідно групам дослідження. Згідно розробленої нами методики передопераційного опромінення, яка включала в себе на першому етапі HDR-

брахітерапію, в першій групі 50 пацієнткам проведено HDR-брахітерапію за методикою нестандартного фракціонування дози - 5+7 Гр, в другій групі 20 пацієнткам – за стандартного методикою фракціонування дози - 5+5 Гр. Після чого усі пацієнти отримували ДПТ в РОД 2 Гр, СОД 20 Гр. Загальна доза опромінення від передопераційного курсу склала 30-32 Гр в залежності від групи пацієнток.

Операційний матеріал піддавали макроскопічному і мікроскопічному дослідженню стандартними методами гістологічної обробки із забарвленням гематоксиліном і еозином. Врахували характер зростання пухлини (екзофітний, ендоефітний, змішаний), гістологічну структуру, відповідно до класифікації ВООЗ 2020 р. [12, 13], ступінь диференціювання пухлини, мітотичну активність, особливості клітинних реакцій у стромі пухлини, наявність і ступінь вираженості дистрофічних і регресивних змін неоплазії, наявність некрозів, апоптозів.

Для гістологічного дослідження було висічено фрагменти тканини розміром 1,5x1,5x0,3 см, які фіксовано в 10 % розчині нейтрального формаліну, забуференому фосфатним буфером. Потім матеріал піддавали стандартній проводці по етанолах зростаючої концентрації, хлороформом, після чого його було залито парафіном. З приготовлених парафінових блоків виготовлялися серійні зрізи завтовшки 3–4 мкм. В усіх випадках використовували стандартний метод забарвлення гематоксиліном і еозином.

Для аналізу ступеню терапевтичного впливу на тканинну структуру пухлини використовувалася морфологічна класифікація лікувального патоморфозу Е. Ф. Лушнікова [14], відповідно до якої виділені IV його ступеня:

- I ступінь – зміни на молекулярному і субклітинному рівні. У тканинах, що оточують пухлинні комплекси, зміни не виражені;

- II ступінь – ушкодження в основному паренхіматозних елементів пухлини (дистрофічні і некробіотичні зміни клітин пухлини, порушення поділу клітин з появою гігантських форм). У стромі пухлини – судинні зміни, активація клітин сполучної тканини;

- III ступінь – порушення типової структури пухлини в результаті масової загибелі пухлинних клітин (поля некрозу, виражені судинні розлади, розростання сполучної тканини). Зберігаються стійкі до терапії популяції пухлинних клітин без грубих ушкоджень, які в подальшому можуть призводити до розвитку рецидиву пухлини. Велике число «лікувальних форм» – клітинних гігантів. У навколишніх тканинах – атрофічні і дистрофічні зміни;

- IV ступінь – заміщення некротизованої пухлинної тканини сполучною тканиною, ім-

пегнація її солями вапна, утворення кіст. У навколишніх тканинах – атрофічні, дистрофічні і склеротичні зміни.

Відносна вага строми, паренхіми, вогнищ некрозу, об'єму залишкової пухлини визначалась з використанням окуляр-мікрометра і окулярної лінійки.

Проліферативну активність ракового епітелію оцінювали за допомогою визначення мітотичного індексу (МІ) за формулою:

$$MI = N (\text{мітоз}) / N \times 100\%,$$

де N (мітоз) – число пухлинних клітин с фігурами мітозів; N – загальне число пухлинних клітин на 1мм² площі зрізу. Рівень апоптозу ракових епітеліоцитів оцінювали за допомогою визначення апоптичного індексу (АІ):

$$AI = N (\text{апоптоз}) / N \times 100\%,$$

де N (апоптоз) – число пухлинних клітин в стані апоптозу; N – загальне число пухлинних

клітин.

Підрахунок результатів здійснювали за допомогою окулярної сітки Автанділова [15] у 10 довільно вибраних полях зору при збільшенні x400.

Статистичну обробку первинних даних проводили з використанням методів варіаційної статистики (Statistica 10).

Результати та їх обговорення

У відповідності до класифікації ВООЗ (2020) морфологічні форми РШМ були представлені переважно плоскоклітинним раком – 68,6 %, аденокарцинома була виявлена у 18,6 % спостережень, недиференційована карцинома – в 7,1 % випадків, частка залозисто-плоскоклітинного раку склала 5,7 %.

Розподіл гістологічних варіантів РШМ по групах представлений у таблиці 1.

Таблиця 1

Гістологічні варіанти РШМ

Гістологічна форма РШМ	1 група n=50	2 група n=20
Плоскоклітинна карцинома (M8070/3)	36 (72,0 %)	12 (60,0 %)
Аденокарцинома (M8140/3)	8 (16,0 %)	5 (25,0 %)
Аденоскваозна карцинома (M8560/3)	2 (4,0 %)	2 (10,0 %)
Недиференційована карцинома (M8020/3)	4 (8,0 %)	1 (5,0 %)

В обох групах дослідження ми спостерігали односпрямовані морфологічні ознаки лікувального патоморфозу. Типова структура карцином була порушена у результаті масової загибелі пухлинних клітин. В 35,7 % випадків у зоні крововиливів було виявлено дистрофічні та некробіотичні зміни клітин і волокнистих структур різного ступеню вираженості, які розвинулися на тлі дисциркуляторних розладів, у тому числі свіжого тромбоутворення.

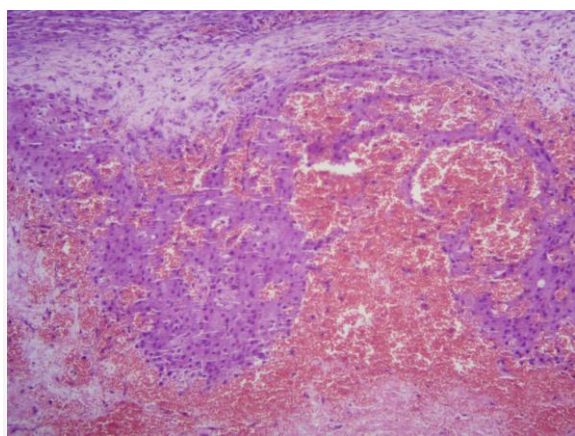


Рис. 1. Дрібновогнищеві некрози плоскоклітинного РШМ, масивні крововиливи в паренхімі пухлини і сполучнотканинному каркасі. 1 група спостереження. Забарвлення гематоксилином і еозином. x100.

Зустрічалися дрібновогнищеві некрози пухлинної паренхіми із руйнуванням не тільки пухлинних клітин, а й сполучно-тканинного каркасу, що супроводжувалося крововиливами та осередковими інтерстиціальними плазморагіями (рис. 1).

У 52,8 % від загальної кількості пухлинних зразків спостерігалося утворення так званих «променеви́х гігантів» (рис. 2).

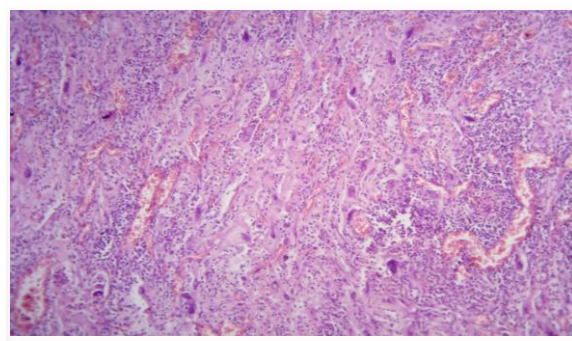


Рис. 2. Багатоядерні гігантські клітини на тлі некрозів та судинних розладів. 1 група спостереження. Забарвлення гематоксилином і еозином. x100.

Ступінь поширеності вогнищ некробіозу і некрозу була більш вираженою у 1-й групі спостереження, пацієнтки якої отримували HDR-брахітерапію у дозуванні 5+7 Гр. Також у препаратах основної групи дослідження чітко визначалися великі вогнища некрозу у вигляді

безструктурної еозинофільної субстанції із дрібнодисперсною нерівномірною зернистістю. Вогнища некрозу були оточені слабо вираженою

лімфоїдноклітинною інфільтрацією, часто із домішкою лейкоцитів та ксантомних клітин (рис. 3 а, б).

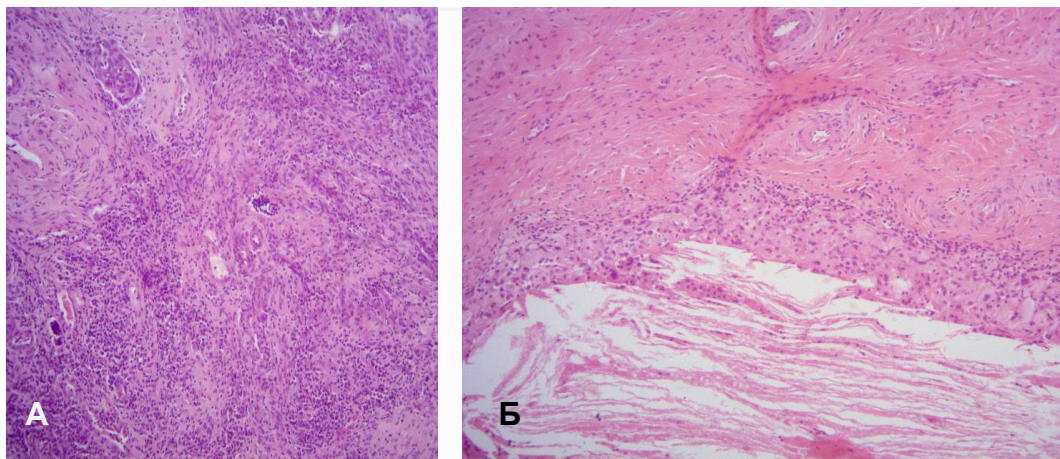


Рис. 3. А – дифузна лімфоїдноклітинна інфільтрація навколо поодиноких збережених комплексів плоскоклітинного РШМ; Б – вогнище некрозу із перифокальною ксантомноклітинною реакцією. 1 група спостереження. Забарвлення гематоксиліном і еозином. $\times 100$.

Терапевтичний патоморфоз РШМ

Таблиця 2

Ступінь терапевтичного патоморфозу	Загалом, n=70	1 група, n=50	2 група, n=20
I	-	-	-
II	25 (35,7 %)	13 (26,0 %)	12 (60,0 %)
III	37 (52,9 %)	31 (62,0 %)	6 (30,0 %)
IV	4 (5,7 %)	4 (8,0 %)	-

Примітка: * - $p \leq 0,005$.

Більше ніж у половині випадків у стромі шийки матки відзначалося виражене фіброзування, у 1-й групі у 2,3 рази частіше (70,0 % проти 30,0 % відповідно), $p=0,0011$.

Наявність апоптотичних тілець відмічено у 92,8 % препаратів. Коливання індексу апоптозу в досліджуваній групі відмічено від 10,0 до 70,0 %, в контрольній групі – від 7,0 до 54,0 %, причому найнижчі його значення відмічено у зонах дрібновогнищевих некрозів та крововиливів, тоді як високі – в ділянках великих некрозів і в зонах розростання сполучної тканини. Середній показник AI у 1-й групі був майже у 2 рази вищий у порівнянні із 2-ю групою (47,5 % та 25,7 %, відповідно), $p=0,0471$ (рис. 4).

Коливання показнику MI в обох групах були практично однаковими – 2,0-23,0 % у 1-й та 5,0-21,0 % у 2-й групі, однак середнє його значення в основній групі було нижчим (11,6 % проти 15,8 %), $p=0,3173$.

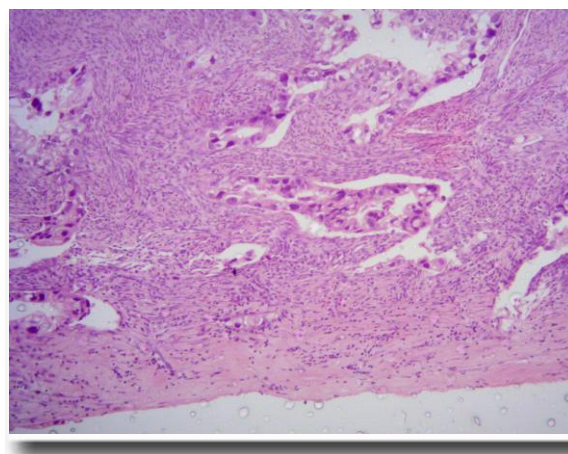


Рис. 4. Численні апоптотичні тільця в аденокарциномі шийки матки. 1 група спостереження. Забарвлення гематоксиліном і еозином. $\times 100$.

Таким чином, ознаки лікувального патоморфозу ми виявили в 94,3 % усіх спостережень РШМ. Патоморфоз I-II ступеню (регресія < 50 % паренхіми пухлини) спостерігався в обох гру-

пах: 28,0 % у 1-ї і 70,0 % у 2-ї ($p=0,0006$). Патоморфоз III ступеню (регресія $>50\%$ пухлини) виявлено у 62,0 % випадків 1-ї та в 30,0 % спостережень 2-ї групи ($p=0,0077$). Повної регресії (патоморфоз IV ступеню) виявлено лише у 8,0 % випадках в 1-ї досліджуваній групі (табл. 2).

Висновки

Основними критеріями ефективності передопераційного лікування РШМ є повна регресія або регресія $>50\%$ пухлинної тканини в операційному матеріалі. Виявлені нами ознаки лікувального патоморфозу III та IV ступеню у 70,0 % спостережень 1-ї групи (проти 30,0 % 2-ї групи) можуть свідчити про більшу ефективність HDR-брахітерапії у дозуванні 5+7 Гр, ніж у дозуванні 5+5 Гр (із урахуванням ДПТ у СОД 20 Гр) при передопераційному променево-му лікуванні пацієток із РШМ ІВ-ІА стадіях.

Середній показник індексу апоптозу у 1-ї групі був майже у 2 рази вищий у порівнянні із 2-ю групою (47,5% та 25,7 %, відповідно), а середнє значення мітотичного індексу було у 1,5

рази нижчим в основній групі (11,6% проти 15,8%).

Перспективи подальших розробок

Актуальним є проведення подальших досліджень, спрямованих на розробку нових методик лікування хворих на РШМ із застосуванням HDR-брахітерапії поряд із ДПТ та хіміотерапією, для оцінки ефективності яких буде проаналізовано патоморфоз пухлини на етапах лікування.

Інформація про конфлікт інтересів

Потенційних або явних конфліктів інтересів, що пов'язані з цим рукописом, на момент публікації не існує та не передбачається.

Джерела фінансування

Публікація пов'язана із дослідницьким проектом МАГАТЕ «Застосування методик HDR-брахітерапії при раку шийки матки» (IAEA Research Project: «Implementation of HDR Brachytherapy Techniques for Cervical Cancer»).

Літературні джерела

References

1. Cibula D, Pötter R, Planchamp F, Avall-Lundqvist E, Fischerova D, Haie Meder C, Köhler C, Landoni F, Lax S, Lindegaard JC, Mahantshetty U, Mathevet P, McCluggage WG, McCormack M, Naik R, Nout R, Pignata S, Ponce J, Querleu D, Raspagliesi F, Rodolakis A, Tamussino K, Wimberger P, Raspollini MR. The european society of gynaecological oncology/european society for radiotherapy and oncology/european society of pathology guidelines for the management of patients with cervical cancer. *International Journal of Gynecological Cancer*. 2018;28:641-655. DOI: 10.1097/IGC.0000000000001216.
2. Park KJ, Roma A, Singh N, Gilks CB, Oliva E, Abu-Rustum N, Ramirez PT, McCluggage WG. Tumor staging of endocervical adenocarcinoma: recommendations from the international society of gynecological pathologists. *International Journal of Gynecological Pathology*. 2021;40(1):92-101. DOI: 10.1097/PGP.0000000000000758
3. Baiocchi G, de Brot L, Faloppa CC, Mantovan H, Duque MR, Badiglian-Filho L, da Costa AABA, Kumagai LY. Is parametrectomy always necessary in early-stage cervical cancer? *Gynecological Oncology*. 2017;146(1):16-19. DOI: 10.1016/j.ygyno.2017.03.514.
4. Diab Y. Sentinel lymph nodes mapping in cervical cancer: a comprehensive review. *International Journal of Gynecological Cancer*. 2017;27(1):154-158. DOI: 10.1097/IGC.0000000000000853.
5. Bhatla N, Aoki D, Sharma DN, Sankaranarayanan R. Cancer of the cervix uteri. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*. 2018;143(2):22-36. DOI: 10.1002/ijgo.12611.
6. Horn LC, Brambs CE, Handzel R, Lax S, Sändig I, Schmidt D, Schierle K. [Cervical cancer: Update on morphology]. *Pathologie*. 2016;37(6):542-548. German. DOI: 10.1007/s00292-016-0232-2.
7. Zivarpour P, Nikkha E, Maleki Dana P, Asemi Z, Hallajzadeh J. Molecular and biological functions of gingerol as a natural effective therapeutic drug for cervical cancer. *Journal of Ovarian Research*. 2021;14(1):43. DOI: 10.1186/s13048-021-00789-x.
8. Xie L, Chu R, Wang K, Zhang X, Li J, Zhao Z, Yao S, Wang Z, Dong T, Yang X, Su X, Qiao X, Song K, Kong B. Prognostic assessment of cervical cancer patients by clinical staging and surgical-pathological factor: a support vector machine-based approach. *Frontiers in Oncology*. 2020;10:1353. DOI: 10.3389/fonc.2020.01353.
9. Raspollini MR, Lax SF, McCluggage WG. The central role of the pathologist in the management of patients with cervical cancer: ESGO/ESTRO/ESP guidelines. *Virchows Archive*. 2018;473(1):45-54. DOI: 10.1007/s00428-018-2372-7.
10. McCluggage WG, Judge MJ, Alvarado-Cabrero I, Duggan MA, Horn LC, Hui P, Ordi J, Otis CN, Park KJ, Plante M, Stewart CJR, Wiredu EK, Rous B, Hirschowitz L. Data set for the reporting of carcinomas of the cervix: recommendations from the international collaboration on cancer reporting (ICCR). *International Journal of Gynecology and Obstetrics*. 2018;143(2):22-36. DOI: 10.1002/ijgo.12611.

logical Pathology. 2018;37(3):205-228. DOI: 10.1097/PGP.0000000000000412.

11. Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C, authors. TNM classification of malignant tumours, 8th edition. Oxford: Wiley-Blackwell; 2017. 272 p.

12. Turashvili G. Cervix. Squamous cell carcinoma and variants. Pathology Outlines. 2022.1.1-13 Available from: <https://www.pathologyoutlines.com/topic/cervixSCC.html>.

13. Herrington CS. WHO classification of tumours of female genital tumors. International Agency for Research on Cancer. 2020;4(5):632.

14. Smolyannikova AV. Patolohoanatomicheskaya diahnozyka opukholey cheloveka [Pathological diagnostics of human tumors]. Meditsina; 1993;1:130-158. Russian.

15. Avtandilov GG, author. Osnovy kolichestvennoy patolohicheskoy anatomii [Fundamentals of quantitative pathological anatomy]. Moskva: Medicina; 2002. 240 p. Russian.

Сухін В.С., Грановська Г.І., Данилюк С.В. Морфологічні особливості терапевтичного патоморфозу раку шийки матки після передопераційної HDR-брахітерапії.

РЕФЕРАТ. Актуальність проблеми оптимізації лікувальних програм хворих на рак шийки матки обумовлена відсутністю раціональних режимів фракціонування дози при передопераційній променевої терапії. **Метою** нашого дослідження було провести порівняльний аналіз та оцінити ефективність різних доз передопераційної HDR-брахітерапії та їх фракціонування за даними терапевтичного патоморфозу пухлини. **Методи.** Нами було досліджено 50 зразків операційного матеріалу хворих на рак шийки матки стадій ІВ-ІІА, яким проведено передопераційну HDR-брахітерапію за методикою нестандартного фракціонування дози 5+7 Гр, та 20 зразків пухлини із групи контролю із стандартним фракціонуванням дози 5+5 Гр. Після чого усі пацієнти отримували курс дистанційної променевої терапії (ДПТ в РОД 2 Гр, СОД 20 Гр). Загальна доза опромінення від передопераційного курсу склала 30-32 Гр в залежності від групи пацієнток. Операційний матеріал піддавали макроскопічному та мікроскопічному дослідженням стандартними методами гістологічної обробки із забарвленням гематоксилином і еозином. Враховували характер зростання пухлини, гістологічну структуру, ступінь диференціювання пухлини, мітотичну активність, особливості клітинних реакцій у стромі пухлини, наявність і ступінь вираженості дистрофічних і регресивних змін неоплазії, наявність некрозів та апоптозу. Основним критерієм оцінки якості передопераційного лікування раку шийки матки є повна регресія або регресія > 50% пухлини в операційному матеріалі. У **результаті** аналізу отриманих даних, патоморфоз І-ІІ ступеню (регресія <50% паренхіми пухлини) спостерігався в обох групах: 28,0 % у 1-ї і 70,0 % у 2-ї групах. Патоморфоз ІІІ ступеню (регресія >50%) відзначено у 62,0 % випадків 1-ї та в 30,0 % спостережень 2-ї групи. Повну регресію (патоморфоз ІV ступеню) виявлено у 8,0 % випадків лише в 1-й досліджуваній групі. **Висновки.** Виявлені нами ознаки лікувального патоморфозу ІІІ та ІV ступеню у 70,0 % спостережень основної групи (проти 30,0 % групи контролю) можуть свідчити про більшу ефективність передопераційної HDR-брахітерапії, проведеною за методикою нестандартного фракціонування дози 5+7 Гр при раці шийки матки ІВ-ІІА стадій.

Ключові слова: рак шийки матки, HDR-брахітерапія, доза опромінення, терапевтичний патоморфоз, морфологічні особливості.

I.K. Хархаліс¹
I.C. Шпонька²
O.B. Пославська²

¹ Ужгородський національний
університет, Ужгород

² Дніпровський державний ме-
дичний університет, Дніпро

Надійшла: 24.10.2022

Прийнята: 15.12.2022

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2022.4.32-40>

УДК: 616-006.04-076-097.3-079.4

ОЦІНКА ЕКСПРЕСІЇ МАРКЕРІВ β - САТЕНІН ТА CYCLIN D1 В ЗАЛЕЖ- НОСТІ ВІД КЛІНІКО- МОРФОЛОГІЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК ТА ПРОЛІФЕРАТИВНОЇ АКТИВНОСТІ КОЛОРЕКТАЛЬНИХ КАРЦИНОМ

Kharkhalis I.K. , Shponka I.S. , Poslavskaya O.V.  ✉ Evaluation of the expression of β -catenin and cyclin D1 markers depending on the clinical and morphological characteristics and proliferative activity of colorectal carcinomas.

Uzhhorod National University, Uzhhorod, Dnipro State Medical University, Dnipro, Ukraine.

ABSTRACT. Background. Colorectal cancer (CRC) is the third most common malignancy in the world and the fourth most common cause of death from all cancers. The progression of neoplasia in the large intestine depends on a sequence of genetic errors that eventually lead to the appearance of malignant tumors. The earliest known mutation in this progression is the inactivation of the polyposis coli adenomatous tumor suppressor gene. It is important to identify molecular prognostic markers for prognosis, which will help in choosing a therapeutic course of strategy and further improving the survival of patients with CRC. Much attention has been paid to the involvement of cyclin D1 in tumor development and progression. **The aim** of the study was to evaluate the prognostic significance of the expression of β -catenin and cyclin D1 markers depending on the clinical and morphological characteristics and proliferative activity of colorectal carcinomas. **Methods.** In the work, the clinical and anatomical material of CRC of 37 patients (15 women and 22 men) who were treated in the 2nd surgical department of the ME "Dnipropetrovsk Regional Clinical Hospital named after I.I. Mechnikova", Dnipro, Ukraine, in the period from 2019 to 2021. The age of the patients ranged from 27 to 82 years, the average age was 61.43 ± 14.90 years. Primary monoclonal antibodies to Ki-67 (sp6, 1:250), β -catenin (Beta Catenin – 1, clone EP35, RTU), cyclin D1 (clone EP12, RTU) and the UltraVision Quanto imaging system, (LabVision) were used for immunohistochemical research. The photographed fields of view were processed in the Fiji platform with the calculation of the percentages of Ki-67 and cyclin D1 positive intranuclear reactions with the ImmunoRatio plugin. **Results.** The distribution of variants of typical (membrane) and aberrant (cytoplasmic or cytoplasmic-nuclear) expression of the β -catenin marker demonstrated a significant difference in subgroups of colorectal carcinomas G2 / G3 according to the degree of differentiation ($p < 0.05$), in subgroups with / without metastases ($p < 0.05$) and in subgroups of carcinomas with different proliferative activity ($p < 0.05$). Aberrant (nuclear-cytoplasmic, nuclear dot-like and cytoplasmic with empty nuclei) expression of cyclin D1 in colorectal carcinomas was found much less often (8 out of 37; 21.62%) compared to the β -catenin marker, where atypical reactions accounted for more than half of all cases (24 out of 37; 64.86%). A statistically significant difference in the distribution of aberrant expressions of cyclin D1 was shown in subgroups with different localization (right-sided / left-sided) ($p < 0.05$) and in subgroups with different proliferative activity according to Ki-67 ($p < 0.05$). The highest percentage of high expression of cyclin D1 was demonstrated by right-sided colorectal carcinomas ($p < 0.05$), carcinomas with a moderate degree of G2 differentiation ($p < 0.05$), the subgroup without metastases ($p < 0.05$) and cases of carcinomas with Ki-67 expression $> 25\%$ ($p < 0.05$).

Key words: colorectal carcinoma, digital morphometry, β -catenin, cyclin D1, Ki-67.


Citation:

Kharkhalis IK, Shponka IS, Poslavskaya OV. [Evaluation of the expression of β -catenin and cyclin D1 markers depending on the clinical and morphological characteristics and proliferative activity of colorectal carcinomas]. Morphologia. 2022;16(4):32-40. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2022.4.32-40>

 Kharkhalis I.K. 0000-0001-9487-4785

 Shponka I.S. 0000-0002-7561-6489

 Poslavskaya O.V. 0000-0002-3133-8413

✉ alexandra.poslavskaya@gmail.com

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Вступ

Колоректальний рак (КРР) є третім за частотою серед злоякісних новоутворень у світі і четвертим за частотою серед причин смерті від всіх онкологічних захворювань [1-3]. Національний канцер-реєстр України в 2020 році на 100 тис. населення за областями України визначив регіони найбільшого поширення раку ободової кишки в Харківській (31,2), Кіровоградській (26,1) і Запорізькій (24,5) областях; та раку прямої кишки – в Сумській (25,4), Полтавській (23,9) і Чернігівській (23,8) областях. Аналіз випадків смертності на 100 тис. населення за областями України показав для раку ободової кишки найвищі показники були в Харківській (19,4), Запорізькій (14,8) і Кіровоградській (14,6); та для раку прямої кишки – в Полтавській (15,2) Сумській (13,9) і Херсонській (12,8) областях [4].

Прогресування неоплазії в товстому кишечнику залежить від послідовності генетичних помилок, які зрештою призводять до виникнення злоякісних пухлин. Найпершою відомою мутацією в цьому прогресуванні є інактивація аденоматозного гена супресора пухлини polyposis coli (APC). В літературі описані мутації в APC на самих ранніх стадіях дисплазії, які називаються аберантними вогнищами, і переважна більшість усіх пухлин, що виникають у товстій кишці, містять мутації в цьому гені [5-8].

Патогенез формування інвазивної форми КРР з аденоми багатоетапний процес, протягом якого відбуваються послідовні молекулярні зміни. До 80% спорадичних пухлин ободової кишки мають класичну аденома-карциному послідовність, що починається з мутації APC. В аденомі обидві копії гену APC інактивовані і не виконують свою ключову функцію з негативної регуляції β -catenin, який в свою чергу переміщується у ядро і активує транскрипцію генів MYC і cyclin D1, які сприяють проліферації, диференціації та підвищенню виживання клітин колоректального епітелію [7-13].

Важливо визначити молекулярні прогностичні маркери для прогнозу, який допоможе у виборі терапевтичного курсу стратегії та подальшого покращення виживаності пацієнтів із КРР. Багато уваги приділено участі cyclin D1 при розвитку та прогресуванні пухлини. Cyclin D1 вважається онкогеном, який може регулювати прогресування від G1 фази клітинного циклу до S фази. Як відомо нам, здатність cyclin D1 керувати клітинним циклом вперед може блокуватися cyclin-D1-залежною кіназою (CDK) інгібітори, такі як p27 і p21. Як ключові регулятори G1 етапу прогресування в клітинному циклі, cyclin D1 підрозуміється, що він відіграє ключову роль у процесі канцерогенезу та прогресування раку [10-11]. Відомо, що експресія cyclin D1 посилюється в різних типах пухлин і зустрічається в одній третині або більше колоректального раку [12-13].

Багато досліджень досліджували чи може надмірна експресія cyclin D1 бути прогностичним фактором для виживання пацієнтів з КРР. Однак результати досліджень є непереконливими та в літературі не досягнуто консенсусу.

Метою дослідження було оцінити прогностичну значущість експресії маркерів β -catenin та cyclin D1 в залежності від клініко-морфологічних характеристик та проліферативної активності колоректальних карцином.

Матеріали та методи

В роботі досліджено клініко-анатомічний матеріал КРК 37 пацієнтів (15 жінок і 22 чоловіків), що був отриманий під час операцій (правобічна геміколектомія, резекція сигмоподібної кишки, операція Гартмана, резекція поперечно-ободової кишки, резекція клубової кишки); всі вони проходили лікування в 2 хірургічному відділенні КП «Дніпропетровська обласна клінічна лікарня ім. І.І. Мечникова» ДОР м. Дніпра в період з 2019 по 2021 рр. Вік пацієнтів коливався в діапазоні 27 – 82 років, середній вік склав $61,43 \pm 14,90$ років. Дослідження схвалено комісією з біоетики ДВНЗ «Ужгородський національний університет» (витяг з протоколу засідання №7/16 від 30 вересня 2020 р.).

За гістологічною будовою всі спостереження були представлені колоректальною карциною (КРК) помірного (31 випадок) та низького (6 випадків) ступеня диференціювання. Гістопатологічні підтипи включали: аденокарциному (АК) NOS 19 випадків, зубчасту АК 7 випадків, мікропапілярну АК 3 випадки, медулярну АК 3 випадки, муцинозна АК 2 випадки, перстнеподібноклітинна АК 2 випадки та 1 АК типу like-adenoma.

Із них з локалізацією у висхідній частині ободової кишки 5 випадків, у печінковому куті 9 випадків, у поперечно-ободовій кишці 6 випадків, у селезінковому куті 1 випадок, у ректосигмоїдному сполученні 5 випадків, у сигмоподібній кишці 10 випадків та у прямій кишці 1 випадок. Таким чином всі спостереження КРК розділились на правобічні КРК (20 випадків) і лівобічні КРК – 17 спостережень. Також весь матеріал був розподілений на дві групи в залежності від наявності метастазів: без метастазів 30 КРК, та з метастазами – 7 спостережень (6 – у лімфатичних вузлах черевної порожнини і 1 – в печінці).

Морфологічний метод дослідження. Зразки пухлин КРК фіксованих у формаліні і залиті парафіном були взяті з архіву КЗ «Дніпровського обласного патологоанатомічного бюро». Парафінові зрізи 4-5мм були отримані на мікромомі Microm HM-340 і забарвлених за стандартною методикою гематоксиліном й еозинном (Г-Е). Два патологоанатома незалежно один від одного перевіряли скельця на точність діагнозу та наявність артефактів. За внутрішній контроль прий-

мали нормальну тканину товстої кишки, що зустрічалась в скельцях на границі з пухлинною тканиною. Мікроскопія проводилась за допомогою світлового мікроскопу ZEISS "Primo Star" (об'єктиви $\times 10$, $\times 20$, $\times 40$)

Імуногістохімічний метод дослідження. Парафінові зрізи наносили на адгезивні предметні скельця SuperFrost Plus. Після депарафінізації, регідратації, температурного демаскування антигенів та пригнічення активності ендогенної пероксидази, проводили інкубацію зрізів з первинними антитілами у вологих камерах при температурі 23 – 25°C на протязі 30 хвилин. Використовувалися первинні антитіла до Ki-67 (sp6, 1:250), β -catenin (Beta Catenin – 1, клон EP35, RTU), cyclin D1 (клон EP12, RTU) та система візуалізації UltraVision Quanto, (LabVision) у вологих камерах біля 30 хвилин при кімнатній температурі. Для ідентифікації реакції наносився розчин хромогену 3-діамінобензидин тетраклориду під контролем мікроскопу протягом від 20 секунд до 3 хвилин, з проявом у вигляді коричневого забарвлення, далі додатково забарвлювали гематоксиліном Майєра протягом 1-3 хвилини. Наступна дегідратація і включення у бальзам здійснювалися згідно стандартної методики.

Для цифрової морфометрії використовувалась камера мікроскопу Zeiss Primo Star - AxioCam ERC 5s з ліцензованим програмним забезпеченням ZEN 2 blue edition. Сфотографовані поля зору були збережені в форматі .jpg і оброблені в платформі Fiji з розрахунком відсотків Ki-67 та cyclin D1 позитивних інтрануклеарних реакцій плагіном ImmunoRatio [14-16].

За рекомендаціями Amani Kazem із співавт. (2014), оцінка β -catenin ґрунтувалась на розподілі β -catenin всередині клітини: мембрана експресія (0-1), цитоплазма (0-1) і ядра (0-2). Показник розраховувався шляхом додавання балів: сума ядерних балів (+2 = позитивна експресія; +1 = слабка експресія; 0 = відсутність експресії), оцінка цитоплазми (+2 = позитивна експресія; +1 = слабка експресія; 0 = відсутність експресії) та оцінка мембрани (0 = позитивна експресія на мембрані; +1 = негативна мембранна експресія). Таким чином, «типова експресія» характеризувалась загальним балом 0, що відображала лише фарбування клітинної мембрани, подібне до фарбування нормальної слизової оболонки товстої кишки, «аберантна експресія» показувала бали з 1 до загальної оцінки 5 (5 для пухлин із сильним ядерним фарбуванням (+2), дифузним фарбуванням цитоплазми (+2) і втратою клітинної мембрани (+1)) [9].

За рекомендаціями Abdulkader Mohammed Albasri. із співавт. (2019) інтерпретація ядерного фарбування відсотку cyclin D1 за напівкількісною шкалою: 0, менше 5%; 1, 5-25%; 2, 26-50%; 3, 51-75%; 4 - понад 75%. Фарбування від 0 до 1, було оцінено як слабка експресія, від 2 до 4 –

як висока [7].

За рекомендаціями Melling N. із співавт. (2016) для статистичного аналізу результати фарбування маркером Ki-67 були розподілені на три групи (слабка, помірна, висока) за відсотком Ki-67-позитивних пухлинних клітин: низький Ki-67: 0%-10%; помірний Ki-67: з 10% до 25%; висока Ki-67: 25% і більше [17].

Статистичний аналіз даних проводили в програмному середовищі R version 3.4.1 (2017-06-30) -- "Single Candle" Copyright (C) 2017; The R Foundation for Statistical Computing Platform: x86_64-w64-mingw32/x64 (64-bit), що поширюється безкоштовно за ліцензією GNU General Public License.

Встановлення достовірності міжгрупових зв'язків за кількісним розподілом проводилось за допомогою точного тесту Фішера, відмінність в розподілі вважали достовірною при $p < 0,05$. Дані в таблицях представлені як $M \pm SD$ (середнє значення \pm стандартне відхилення).

Результати та їх обговорення

Дослідження особливостей експресії маркера β -catenin виявило типовий варіант експресії – виключно мембрана експресія ($n=13$), подібна до нормальної експресії в тканині внутрішнього контролю (рис. 1 А), і аберантний варіант експресії ($n=24$), що включав цитоплазматичний (рис. 1 Б) та цитоплазматично-ядерний варіанти (рис. 1 В, Г).

Серед чоловіків аберантна експресія β -catenin зустрічалась в 59,09% (13 з 22) випадків, порівняно з жінками, де цитоплазматично-ядерних варіантів виявилось більше 73,33% (11 з 15). За віком (до 50, 50-75 та більше 75 років) розподіл виявився рівномірний 66,67%, 63,63% та 66,67% відповідно, тож статистично достовірної різниці знайдено не було ($p > 0,05$). Як і між правобічними та лівобічними КРК (65,00% та 64,70%, $p > 0,05$). Серед різних гістологічних варіантів абсолютну більшість (100%) аберантних експресій β -catenin продемонстрували мікропапілярні аденокарциноми (АК) (3 з 3), муцинозні АК (2 з 2) та АК like-adenoma (1 з 1). Взагалі всі гістологічні варіанти КРК показали переважання аберантних експресій β -catenin, крім медулярної АК (1 з 3, 33,33%).

Серед КРК з різним ступенем диференціювання більшість аберантних експресій β -catenin було виявлено в карциномах G2 (21 з 31, 67,74%), в той час як серед карцином G3 таких випадків була половина (3 з 6, 50,00%). Але треба зазначити, що найбільша різниця відчувалась в підгрупах з різною проліферативною активністю (до 10%, 10-25% та більше 25%), де найбільша кількість варіантів з цитоплазматично-ядерною експресією β -catenin показали проліферативну активність вище 25% (40,00%, 57,89%, 84,61%) ($p < 0,05$). Дані розподілу варіантів експресії β -catenin занесені в таблицю 1.

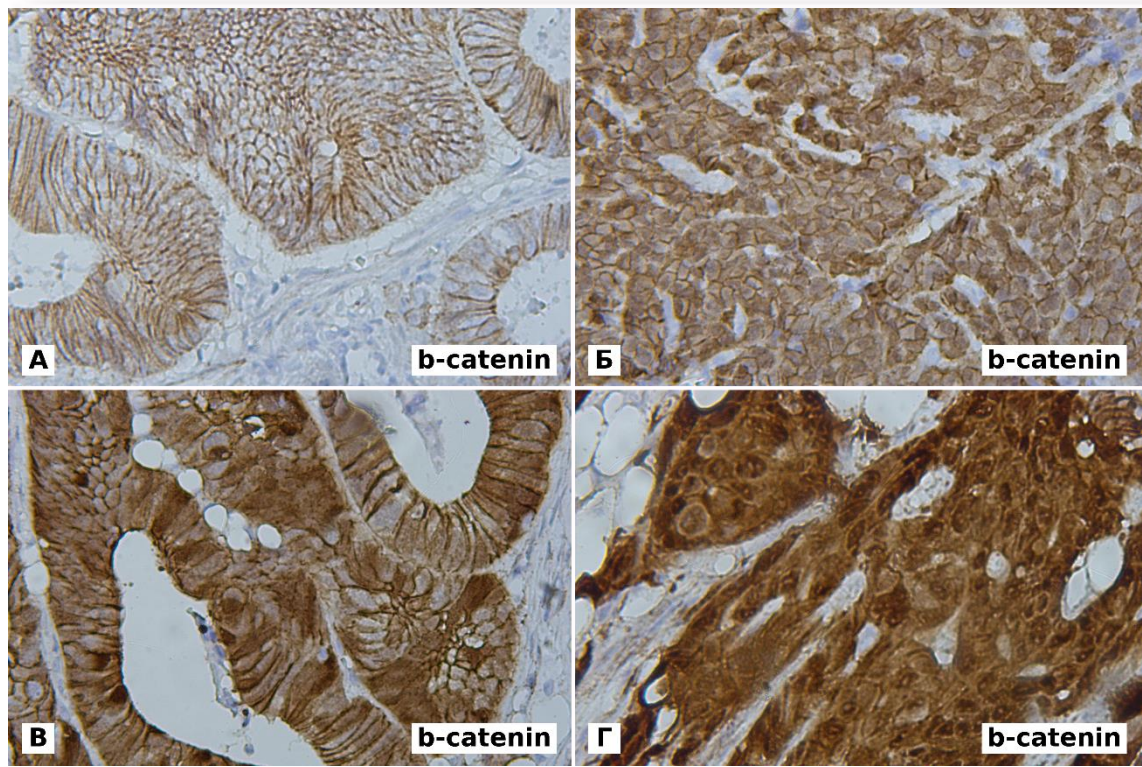


Рис. 1. Варіанти експресії маркера β -catenin, ІГХ дослідження з гематоксилином Майєра ($\times 400$). А. Типове виключно мембранне забарвлення маркера β -catenin, подібне до нормального в непухлинній тканині. Б. Аберантна, цитоплазматична експресія маркера β -catenin. В. Аберантна, мембранно-цитоплазматична експресія з поодинокими забарвленими ядрами. Г. Аберантна, інтенсивна цитоплазматична експресія маркера β -catenin з множиними забарвленими ядрами.

Таблиця 1
Розподіл варіантів експресії маркера β -catenin за клініко-морфологічними характеристиками колоректальних карцином

Клініко-морфологічна характеристика КРК	n (%) n=37	Варіант експресії β -catenin	
		Типова (мембранна)	Аберантна (цитоплазматична, ядерно-цитоплазматична)
Чоловіки	22 (59,46)	9	13
Жінки	15 (40,54)	4	11
p			p>0,05
Вік <50	9 (24,32)	3	6
50-75	22 (59,46)	8	14
>75	6 (16,22)	2	4
p			p>0,05
Правобічні	20 (54,05)	7	13
Лівобічні	17 (45,95)	6	11
p			p>0,05
АК NOS	19 (51,35)	8	11
Зубчаста АК	7 (18,91)	2	5
Мікропапілярна АК	3 (8,10)	0	3
Медулярна АК	3 (8,10)	2	1
Муциозна АК	2 (5,40)	0	2
Перстнеподіб. АК	2 (5,40)	1	1
АК like-adenoma	1 (2,70)	0	1
p			p*

Клініко-морфологічна характеристика КРК	n (%) n=37	Варіант експресії β -catenin	
		Типова (мембранна)	Аберантна (цитоплазматична, ядерно-цитоплазматична)
G2	31 (83,78)	10	21
G3	6 (16,22)	3	3
P			p<0,05
Без метастазів	30 (81,08)	9	21
З метастазами	7 (18,92)	4	3
P			p<0,05
Ki-67 <10 %	5 (13,51)	3	2
10-25 %	19 (51,35)	8	11
>25 %	13 (35,13)	2	11
P			p<0,05

Примітка: АК NOS – аденокарцинома неспецифікована, M \pm SD – середнє \pm стандартне відхилення, p* – статистичний аналіз був неможливий через відсутність значень в деяких підгрупах.

Варіанти експресії sucln D1 також відрізнялись розподілом на типову експресію (ядерну) (рис. 2 А), що зустрічалась у внутрішньому контролі слизової кишківника (n=29), та аберантну

(ядерно-цитоплазматичну, ядерну dot like та цитоплазматичну з порожніми ядрами) (рис. 2 Б-Г), що мала місце тільки в тканині пухлин (n=8).

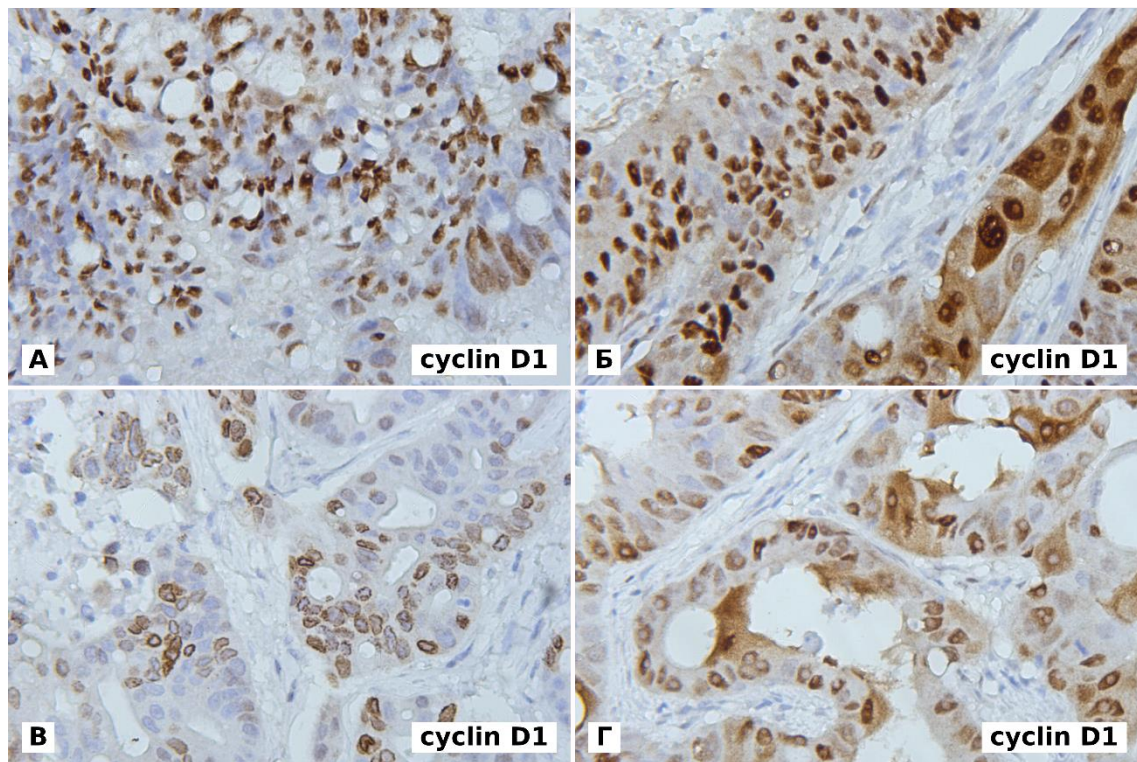


Рис. 2. Варіанти експресії маркера sucln D1, ІГХ дослідження з гематоксином Майєра ($\times 400$). А. Типова – виключно ядерна експресія sucln D1, подібна до внутрішнього контролю. Б. Аберантна ядерно-цитоплазматична експресія sucln D1. В. Аберантна навколяядерна dot like експресія sucln D1 у вигляді гранулярного накопичення хромогену. Г. Аберантна цитоплазматична експресія sucln D1 з порожніми ядрами.

Але треба зазначити, що на відміну від маркера β -catenin, де нетипові реакції мали більшість відсотків (24 з 37; 64,86%), для sucln D1 аберан-

тні реакції склали всього (8 з 37; 21,62%). Тому оцінка сили експресії sucln D1 нами була врахована ще й за відсотком забарвлених клітин: \leq

25% - низька експресія (low) та >26% - висока експресія (high). Цікавим виявився факт розподілу всіх випадків КРК за цим критерієм практич-

но навіл 18 зразків low (48,65%) та 19 зразків high (51,35%) Результати розподілу експресії sucln D1 були занесені в таблицю 2.

Таблиця 2
Розподіл варіантів та відсотку експресії маркера sucln D1 за клініко-морфологічними характеристиками колоректальних карцином

Клініко-морфологічна характеристика КРК	n (%) n=37	Тип експресії sucln D1		Експресія sucln D1 у %	
		Типова (n)	Аберантна (n-c, n+dot like)	≤ 25% (low)	> 26% (high)
Чоловіки	22 (59,46)	17	5	10	12
Жінки	15 (40,54)	12	3	8	7
p		p>0,05		p>0,05	
Вік <50	9 (24,32)	7	2	4	5
50-75	22 (59,46)	18	4	11	11
>75	6 (16,22)	4	2	3	3
p		p>0,05		p>0,05	
Правобічні	20 (54,05)	14	6	8	12
Лівобічні	17 (45,95)	15	2	10	7
P		p<0,05		p<0,05	
АК NOS	19 (51,35)	15	4	11	8
Зубчаста АК	7 (18,91)	6	1	5	2
Мікропапілярна АК	3 (8,10)	1	2	1	2
Медулярна АК	3 (8,10)	3	0	0	3
Муциозна АК	2 (5,40)	2	0	1	1
Перстнеподіб. АК	2 (5,40)	1	1	0	2
АК like-adenoma	1 (2,70)	1	0	0	1
p		p*		p*	
G2	31 (83,78)	24	7	17	14
G3	6 (16,22)	5	1	1	5
p		p>0,05		p<0,05	
Без метастазів	30 (81,08)	23	7	13	17
З метастазами	7 (18,92)	6	1	5	2
P		p>0,05		p<0,05	
Ki-67 <10 %	5 (13,51)	5	0	3	2
10-25 %	19 (51,35)	16	3	10	9
>25 %	13 (35,13)	8	5	5	8
P		p**<0,05		p<0,05	

Примітка: АК NOS – аденокарцинома неспецифікована, M±SD – середнє±стандартне відхилення, m-мембранна, c-цитоплазматична, n-нуклеарна (ядерна), p* - статистичний аналіз був неможливий через відсутність значень в деяких підгрупах, p** - статистичний аналіз був проведений між підгрупами (Ki-67 10 %-25 %) та (Ki-67 >25 %).

У підгрупі чоловіків кількість аберантних експресій sucln D1 (5 з 22; 22,7%) виявилась невисокою і майже однаковою з підгрупою жінок (3 з 15; 20,00%) (p>0,05), але кількість high випадків склала більше половини (12 з 22; 54,54%) у чоловіків, порівняно з (7 з 15; 46,67%) у жінок (p>0,05).

В підгрупах за віком (<50; 50-75; >75) найбільший відсоток аберантних реакцій sucln D1 припав на вік >75 років (2 з 6; 33,33%), а найбільший відсоток high експресій навпаки у наймолодших пацієнтів <50 років (5 з 9; 55,55%), але достовірної різниці за точним тестом Фішера знайдено не було (p>0,05), (табл. 2).

Правобічні КРК відзначились в 2 рази більшим відсотком аберантних реакцій sucln D1, порівняно з лівобічними КРК (6 з 20; 30,30% проти 2 з 17; 11,76%) (p<0,05), а також більшою кількістю high експресій sucln D1 (12 з 20; 60,00% проти 7 з 17; 41,17%) (p<0,05).

Серед різних гістологічних типів КРК найбільша кількість аберантних реакцій sucln D1 виявилась в мікропапілярних АК (2 з 3; 66,67%), перстнеподібноклітинних АК (1 з 2; 50,00%) та АК NOS (4 з 19; 21,05%). Натомість жодної аберантної експресії не було знайдено в медулярних АК, муциозних АК та АК like adenoma.

Розподіл гістологічних типів КРК за відсот-

ком забарвлених клітин маркером *suclin D1* виявився геть іншим. Найбільший відсоток *high* експресії *suclin D1* продемонстрували медулярні АК (3 з 3; 100%), перстенеподібноклітинні АК (2 з 2; 100%) та АК like adenoma (1 з 1, 100%). І треба зазначити, що всі гістологічні типи КРК мали зразки з *high* експресією *suclin D1* в більшій чи меншій пропорції (табл. 2).

Для Grade підгруп КРК статистично достовірну різницю було знайдено в порівнянні G3 та G2 тільки за кількістю *high* експресії *suclin D1* (5 з 6; 83,33% проти 14 з 31; 45,16% відповідно) ($p < 0,05$), тоді як за розподілом відсотку аберантних експресій *suclin D1* різниці майже не було (1 з 6; 16,66%) для G3 проти (7 з 31; 22,58%) для G2, ($p > 0,05$).

Підгрупи КРК з метастазами і без відзначились більшим відсотком аберантних та *high* експресій *suclin D1* в карциномах без метастазів (7 з 30; 23,33% проти 1 з 7; 14,28%) та (17 з 30; 56,67% проти 2 з 7; 28,57%) відповідно, але статистично достовірної різниці була знайдена тільки в розподілі за відсотком *high* експресій *suclin D1* ($p < 0,05$).

В підгрупах КРК з різною проліферативною активністю за Ki-67 з'ясувалось, що всі випадки карцином з індексом проліферації (ІП) менше 10% зовсім не мали аберантних експресій *suclin D1*, а відсоток випадків КРК з ІП $> 25\%$ та аберантними експресіями *suclin D1* перевищує кількість таких КРК з ІП 10 %-25 % більше ніж в 2 рази (5 з 13; 38,46% проти 3 з 19; 15,79%) ($p < 0,05$). Розподіл КРК з різним ІП за відсотком *high* експресій *suclin D1* виявив чітку тенденцію взаємного збільшення – відсоток надекспресій маркеру *suclin D1* збільшувався від підгрупи (Ki-67 $< 10\%$) до (Ki-67 $> 25\%$), а саме: 2 з 5; 40,00%; 9 з 19; 47,37%; 8 з 13; 61,54% відповідно ($p < 0,05$).

Висновки

1. Розподіл варіантів типової (мембранної) та аберантної (цитоплазматичної або цитоплазматично-ядерної) експресії маркеру β -catenin продемонстрував достовірну різницю в підгрупах колоректальних карцином G2 / G3 за ступенем диференціювання ($p < 0,05$), в підгрупах з / без метастазів ($p < 0,05$) та в підгрупах карцином з різною проліферативною активністю ($p < 0,05$).

2. Аберантні (ядерно-цитоплазматичні, ядерні dot like та цитоплазматичні з порожніми ядрами) експресії *suclin D1* в колоректальних карциномах виявлялись значно рідше (8 з 37; 21,62%) порівняно з маркером β -catenin, де нетипові реакції займали більше половини всіх випадків (24 з 37; 64,86%). Статистично достовірну різницю розподіл аберантних експресій *suclin D1* показав в підгрупах з різною локалізацією (правобічні / лівобічні) ($p < 0,05$) та в підгрупах з різною проліферативною активністю за Ki-67 ($p < 0,05$).

3. Найбільший відсоток *high* експресій *suclin D1* продемонстрували правобічно розташовані колоректальні карциноми ($p < 0,05$), карциноми помірного ступеня диференціювання G2 ($p < 0,05$), підгрупа без метастазів ($p < 0,05$) та випадки карцином з експресією Ki-67 $> 25\%$ ($p < 0,05$).

Перспективи подальших досліджень

Планується дослідити особливості експресії маркерів CDX-2, EMA та цитокератинів різних груп в залежності від клініко-морфологічних характеристик та проліферативної активності колоректальних карцином.

Інформація про конфлікт інтересів

Потенційних або явних конфліктів інтересів, що пов'язані з цим рукописом, на момент публікації не існує та не передбачається.

Літературні джерела References

1. Granados-Romero JJ, Valderrama-Treviño AI, Contreras-Flores EH, et al. Colorectal cancer: a review. *International Journal of Research in Medical Sciences*. 2017;5(11):4667-4676. DOI: <http://dx.doi.org/10.18203/2320-6012.ijrms20174914>.

2. Takayama T, Shiozaki H, Doki Y, et al. Aberrant expression and phosphorylation of β -catenin in human colorectal cancer. *British Journal of Cancer*. 1998;77(7):605-613. <https://doi.org/10.1038/bjc.1998.97>.

3. Alexander PG, Matly AAM, Jirapongwattana N, et al. The relationship between the Glasgow Microenvironment Score and markers of epithelial-mesenchymal transition in TNM II-III colorectal cancer. *Human Pathology*. 2022;127:1-11. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2022.05.012>.

4. Fedorenko ZP, Hulak LO, Mykhailovych YuY, et al. [Cancer in Ukraine, 2019-2020. Morbidity, mortality, performance indicators of the oncology service]. *Bulletin of the National Chancery Register of Ukraine*. 2021;22. [Ukrainian.http://www.ncru.inf.ua/publications/BULL_22/](http://www.ncru.inf.ua/publications/BULL_22/).

5. Miyamoto S, Endoh Y, Hasebe T, et al. Nuclear β -catenin accumulation as a prognostic factor in Dukes' D human colorectal cancers. *Oncology Reports*. 2004;12(2):245-251. <https://doi.org/10.3892/or.12.2.245>.

6. Herter P, Kuhnen C, Müller K-M, et al. Intracellular distribution of β -catenin in colorectal adenomas, carcinomas and Peutz-Jeghers polyps. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 1999;125:297-304. <https://doi.org/10.1007/s004320050277>.

7. Abdulrahman ZA, Ismael AT, Jalal JA, Alnuaimy WMT. Significance of B-catenin Immunohistochemical Expression in Colorectal Carcinoma. *Journal of Kurdistan Board of Medical Specialties*. 2018;4(1):51-56.
8. Yang Li, Jun Wei, Chuanhui Xu, et al. Prognostic Significance of Cyclin D1 Expression in Colorectal Cancer: A Meta-Analysis of Observational Studies. *PLoS ONE*. 2014;9(4):e94508. doi:10.1371/journal.pone.0094508.
9. Amani Kazem, Khaled El Sayed, Yasser El Kerm. Prognostic significance of COX-2 and b-catenin in colorectal carcinoma. 2014;50:211-220.
10. Albasri AM, Elkablawy MA, Ansari IA, Alhujaily AS. Prognostic Significance of Cyclin D1 Over-expression in Colorectal Cancer: An Experience from Madinah, Saudi Arabia. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2019;20(8):2471-2476. doi:10.31557/APJCP.2019.20.8.2471.
11. Li Yang, Xiaoqing Tian, Xiang Chen, et al. Upregulation of Rab31 is associated with poor prognosis and promotes colorectal carcinoma proliferation via the mTOR/p70S6K/Cyclin D1 signalling pathway. *Life Sciences*. 2020;257: 118126. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118126>.
12. Ling Cao, Yulin Liu, Dan Wang, et al. MiR-760 suppresses human colorectal cancer growth by targeting BATF3/AP-1/cyclinD1 signaling. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2018;37(83):1-14. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0757-8>.
13. Su Y, Shrubsole MJ, Ness RM, et al. Immunohistochemical Expressions of Ki-67, Cyclin D1, β -Catenin, Cyclooxygenase-2, and Epidermal Growth Factor Receptor in Human Colorectal Adenoma: A Validation Study of Tissue Microarrays. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006;15(9):1719-1726. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-05-0946>.
14. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*. 2012;9(7):676-682. doi:10.1038/nmeth.2019.
15. Poslavska OV. [The methodology of using software for the analysis of digital photomicrographs based on the course of pathomorphology in order to improve the professional level of students and scientists]. *Morphology*. 2015;9(3):122-126. Ukrainian.
16. Poslavska OV. [Determining the linear dimensions and areas of individual morphological objects on photomicrographs using the ImageJ program. *Morphology*]. 2016;10(3):377-381. Ukrainian.
17. Melling N, Kowitz CM, Simon R, et al. High Ki67 expression is an independent good prognostic marker in colorectal cancer. *J Clin Pathol*. 2016;69:209-214. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2015-202985>.

Хархаліс І.К., Шпонька І.С., Пославська О.В. Оцінка експресії маркерів β -catenin та cyclin D1 в залежності від клініко-морфологічних характеристик та проліферативної активності колоректальних карцином.

РЕФЕРАТ. Актуальність. Колоректальний рак (КРР) є третім за частотою серед злоякісних новоутворень у світі і четвертим за частотою серед причин смерті від всіх онкологічних захворювань. Прогресування неоплазії в товстому кишечнику залежить від послідовності генетичних помилок, які зрештою призводять до виникнення злоякісних пухлин. Найпершою відомою мутацією в цьому прогресуванні є інактивація аденоматозного гена супресора пухлини polyposis coli. Важливо визначити молекулярні прогностичні маркери для прогнозу, який допоможе у виборі терапевтичного курсу стратегії та подальшого покращення виживаності пацієнтів із КРР. Багато уваги приділено участі cyclin D1 при розвитку та прогресуванні пухлини. **Метою** дослідження було оцінити прогностичну значущість експресії маркерів β -catenin та cyclin D1 в залежності від клініко-морфологічних характеристик та проліферативної активності колоректальних карцином. **Методи.** В роботі досліджено клініко-анатомічний матеріал КРК 37 пацієнтів (15 жінок і 22 чоловіків), які проходили лікування в 2 хірургічному відділенні КП «Дніпропетровська обласна клінічна лікарня ім. І.І. Мечникова» ДОР м. Дніпра в період з 2019 по 2021 рр. Вік пацієнтів коливався в діапазоні 27 – 82 років, середній вік склав $61,43 \pm 14,90$ років. Для імуногістохімічного дослідження використовувалися первинні моноклональні антитіла до Ki-67 (sp6, 1:250), β -catenin (Beta Catenin – 1, клон EP35, RTU), cyclin D1 (клон EP12, RTU) та система візуалізації UltraVision Quanto, LabVision). Сфотографовані поля зору були оброблені в платформи Fiji з розрахунком відсотків Ki-67 та cyclin D1 позитивних інтрануклеарних реакцій плагіном ImmunoRatio. **Результати та підсумок.** Розподіл варіантів типової (мембранної) та аберантної (цитоплазматичної або цитоплазматично-ядерної) експресії маркеру β -catenin продемонстрував достовірну різницю в підгрупах колоректальних карцином G2 / G3 за ступенем диференціювання ($p < 0,05$), в підгрупах з / без метастазів ($p < 0,05$) та в підгрупах карцином з різною проліферативною активністю ($p < 0,05$). Аберантні (ядерно-цитоплазматичні, ядерні dot like та цитоплазматичні з порожніми ядрами) експресії cyclin D1 в колоректальних карциномах виявлялися значно рідше (8 з 37; 21,62%) порівняно з маркером β -catenin, де нетипові реакції займали більше половини всіх випадків (24 з 37; 64,86%). Статистично достовірну різницю розподіл аберантних експресій cyclin D1 показав в підгрупах з різною локалізацією (правобічні / лівобічні) ($p < 0,05$) та в підгрупах з різною про-

ліферативною активністю за Ki-67 ($p < 0,05$). Найбільший відсоток high експресій cyclin D1 продемонстрували правобічно розташовані колоректальні карциноми ($p < 0,05$), карциноми помірного ступеня диференціювання G2 ($p < 0,05$), підгрупа без метастазів ($p < 0,05$) та випадки карцином з експресією Ki-67 $> 25\%$ ($p < 0,05$).

Ключові слова: колоректальна карцинома, цифрова морфометрія, β -catenin, cyclin D1, Ki-67.

I.I. Яковцова¹
O.V. Янчевський²

¹ Харківська медична академія післядипломної освіти, Харків

² Державний заклад «Луганський державний медичний університет», Рівне



Надійшла: 24.10.2022

Прийнята: 15.12.2022

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2022.4.41-46>

УДК 616.24-006.6-079.4-092.18-08

ОКРЕМІ КЛІНІКО-МОРФОЛОГІЧНІ ТА ІМУНОГІСТОХІМІЧНІ КРИТЕРІЇ ПРОГНОЗУ ДРІБНО-КЛІТИННОГО РАКУ ЛЕГЕНЬ

Yakovtsova I.I. , Yanchevskiy O.V.  ✉ Selected clinico-morphological and immunohistochemical criteria for prognosis of small cell lung cancer.

ABSTRACT. Background. Small cell lung cancer (SCLC) is one of the most aggressive histological forms of lung cancer. It requires combined radiation and chemotherapy at an early stage of the tumour process. Determination of immunohistochemical (IHC) criteria for the clinical course of SCLC is critical for individualized patient treatment tactics. **Objective.** Improvement of the morphological criteria for the prognosis of the course of SCRL based on the study of clinical-morphological and molecular-biological characteristics of primary tumours. **Methods.** Surgically removed SCLC and deceased patients' autopsies were selected. Formed research groups: I localized SCLC (LD-SCLC) and II extensive-stage (ES-SCLC). The period from the moment of diagnosis to the death of the patients was taken into account. IHC study of primary tumours was performed with the determination of the expression of markers: Ki-67, CD56, synaptophysin, pan cytokeratin, vimentin and CD44. **Results.** It was found that the level of proliferative activity of ES-SCLC is lower than the level of LD-SCLC ($p < 0.001$). A direct statistically significant relationship between the survival time and the level of expression of Ki-67 was determined, which characterizes the Ki-67 marker as a criterion for a favourable prognosis of SCLC. A correlational dependence was found to a shorter overall survival (OS) of patients on SCLC among cases with positive expression of vimentin ($p < 0.001$). The appearance of IHC evidence of the processes of epithelial-mesenchymal transformation of SCRL is accompanied by a tendency to the appearance of a stem-like immunophenotype of cancer cells and a partial loss of the neuroendocrine status of the tumour.


Key words: small cell lung cancer, epithelial-mesenchymal transformation, stem phenotype.

Citation:

Yakovtsova II, Yanchevskiy OV. [Selected clinico-morphological and immunohistochemical criteria for prognosis of small cell lung cancer]. Morphologia. 2022;16(4):41-6. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2022.4.41-46>

 Yakovtsova I.I. 0000-0002-1027-9215

 Yanchevskiy O.V. 0000-0002-1243-598X

✉ yanchevskiyalex1985@gmail.com

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Вступ

Дрібноклітинний рак легені (ДКРЛ) складає 15% всіх раків легень у світі та є злоякісною пухлиною з агресивною клінічною поведінкою [1]. 5-річна виживаність пацієнтів складає за різними даними лише 2-7% [1,2,3], а для пацієнтів на ранній стадії ДКРЛ, що отримали комбіновану променеви та хіміотерапію - до 34% [1].

Впровадження концепту щодо індивідуалізованого підходу в терапії раку легень, що засновується на урахуванні низки клініко-морфологічних критеріїв та відкритті великого спектру молекулярно-біологічних особливостей цих пухлин, зробило особливо важливим точну класифікацію та діагностику ДКРЛ.

Серед прогностичних критеріїв ДКРЛ найбільш значущим вважається характеристика розповсюдження пухлинного процесу, що визначається за системою TNM та за поділом на локалізовані ДКРЛ (Л-ДКРЛ) та розповсюджені форми ДКРЛ (Р-ДКРЛ). [4]. Класифікація ДКРЛ також спирається на сучасних методах молекулярно-біологічної діагностики, до арсеналу яких входять такі як: імуногістохімічний, цитогенетичний та метод рідинної біопсії.

Не дивлячись на великий обсяг накопичених знань щодо молекулярних особливостей раків легень, розуміння онкогенезу та тригерних факторів, що сприяють метастазуванню та прогресії дрібноклітинного раку досі не є повним. Найбі-

льшими викликами сучасної онкоморфології є визначенням тригерних факторів агресивної поведінки ДКРЛ та визначення таких молекулярно-генетичних змін в них, вплив на які дозволить уникнути розвитку хіміорезистентності.

Мета дослідження: вдосконалення морфологічних критеріїв прогнозу перебігу ДКРЛ на підставі дослідження клініко-морфологічних та молекулярно-біологічних характеристик первинних пухлин.

Матеріали та методи

Для визначення прогностичних критеріїв ДКРЛ були сформовані групи дослідження: Л-ДКРЛ за даними хірургічного та аутопсійного матеріалу та Р-ДКРЛ, виявлені при автопсії після лікування та з генералізацією пухлинного процесу, що призвела до смерті.

До Л-ДКРЛ входили випадки локалізації пухлини в межах однієї ділянки грудної клітини, включно лімфатичні вузли. Р-ДКРЛ вважались пухлини з ураженням іншої легені, віддалених лімфатичних вузлів чи кісток та внутрішніх органів на момент встановлення діагнозу та верифікованого морфологічно.

До групи Л-ДКРЛ, згідно класифікації TNM 8-го перегляду, входили 2 випадки пухлин стадії T2aN0M0 (ІВ), 5 випадків T3N0M0 (ІВ), 2 випадки T2bN1M0 (ІВ), 1 випадок T3N1M0 (ІІА) та по 2 випадки T3N2M0 (ІІВ) та T4N2M0 (ІІВ). випадки різного рівня ураження легені та лімфатичних вузлів. До групи Р-ДКРЛ входили по 5 пухлин на стадіях T2aN2M1a (ІVА) та T2bN3M1b (ІVА), по 3 пухлини T2aN3M1a (ІVА), T3N3M1b(ІVА) та T4N3M1c (ІVВ), по 2 випадки T3N3M1c (ІVВ), T4N3M1a (ІVА) та по 1 випадку T2bN2M1a (ІVА) та T2bN3M1c (ІVВ).

Окремо був поділ Л-ДКРЛ на дві підгрупи — Л-ДКРЛ без метастазів та Л-ДКРЛ з метастазами. Л-ДКРЛ без метастазів у лімфатичні вузли чи наявності більше одного вузла легені — це ДКРД ІВ стадій (T2a), пухлини розміром 3-4см — 2 випадки та ІВ стадії (T3N0), розмір пухлини — 5-7 см з можливим залучення стінки грудної клітини або перикарду — 3 випадки. Два випадки ІВ стадії були взяті з аутопсійного матеріалу, випадки ІВ стадії — з хірургічного та аутопсійного матеріалу.

До Л-ДКРЛ з метастазами входили випадки ураження іпсилатеральних перибронхіальних та інтрапульмональних лімфатичних вузлів (N1) — 3 спостереження та випадки ураження іпсилатеральних медіастенальних чи підключичних лімфатичних вузлів (N2) — 4 випадки.

Серед 33 спостережень хворих, що отримували лікування з ПХТ, смерть настала у 29 випадках. Середній термін з моменту встановлення діагнозу до смерті склав 10,5±1,3 місяців, найменший — 1 місяць, найбільший — 28 місяців. Серед померлих пацієнтів, що отримували лікування, було 4 випадки ІІВ стадії, решта 25 випа-

дків — ІV стадія.

Було визначено експресію окремих імуногістохімічних маркерів, що мають вплив на біологічну поведінку та прогноз злоякісних пухлин певних локалізацій. До цих маркерів, які часто застосовуються в морфологічній практиці було взято: Ki-67, маркери нейроендокринних тканин (CD56, синаптофізін), маркер епітеліальних клітин — панцитокератин, мезенхімальних тканин — віментин та маркер стоволового фенотипу CD44.

Для оцінки ступеню виразності ІГХ реакції застосовувалась напівкількісна шкала: 0 - негативна, 1 - слабка, 2 - помірна, 3 – виражена реакція з підрахунком в пухлині відсотка клітин, що експресують маркер. У випадках позитивної реакції як CD56, так і синаптофізину рівнем експресії вважався найбільший.

Статистичну обробку результатів дослідження проводили з використанням пакета Statistica 6.0. Зв'язок між ознаками оцінювався за непараметричним критерієм хі-квадрат Пірсона та критерієм Спірмана. Статистично значимим вважалося значення $p < 0,05$.

Результати

Пацієнти ДКРЛ груп дослідження були переважно чоловічої статі — в 82,1%, жіночої — в 17,9% та, як видно з таблиці 1, були представлені в однаковому співвідношенні серед груп Л-ДКРЛ та Р-ДКРЛ.

Не виявлено також різниці між групами дослідження за ознакою віку пацієнтів. Середній вік становив 61,7±1,9 років (табл.1).

Середній термін з моменту встановлення діагнозу до смерті серед Л-ДКРЛ склав 19,7±1,9 місяців, серед Р-ДКРЛ - 9,1±1,3 місяців, різниця достовірна ($p < 0,005$). Таким чином, простежена статистично значуща різниця між терміном виживаності та приналежності пухлин до Л-ДКР чи Р-ДКРД.

Серед морфологічних ознак на рівні рутинного забарвлення Г+Е також не виявлені статистично значущі відмінності між групами дослідження. Мітотична активність ДКРЛ була варіабельною від 10 до 78 мітозів в мм², в середньому 39,5±2,7, ядерні характеристики, так як: площа, форма ядра, відсутність чи непомітність ядерця, гранулярність хроматину, форма ракових клітин, наявність та розповсюдженість некрозів, гістологічний тип будови (солідний, часто гніздний, можливо трабекулярний) — не відрізнялись серед ДКРЛ груп дослідження. Як для Л-ДКРЛ, так і для Р-ДКРЛ не була характерна десмоплазія, базофілія та гіаліноз строми.

Рівень проліферативної активності ДКРЛ був варіабельним від 18 до 77% ракових клітин, середній рівень експресії Ki-67 дорівнював 41,3%±3,1. Встановлена статистично значуща різниця у рівні проліферативної активності між Л-ДКРЛ — 51,4%±4,8 та Р-ДКРЛ — 35,0%±3,4 ($p < 0,001$).

Клініко-морфологічні особливості ДКРЛ груп дослідження

Ознаки	Л-ДКРЛ	Р-ДКРЛ
Стать Ч	11 (78,6%)	21 (84,0%)
Ж	3 (21,4%)	4 (16,0%)
Вік	60,3±2,1	62,3±1,7
Площа ракових клітин	3 діаметра лімфоциту	3 діаметра лімфоциту
Форма ракових клітин	Кругла та овальна, можлива веретеновидна	Кругла та овальна, можлива веретеновидна
Середнє число мітозів у мм ²	41,1±2,6	38,6±2,7
Некрози	Вогнищеві та розповсюджені в 10% (14) пухлин	Вогнищеві та розповсюджені в 100% (25) пухлин

При урахуванні терміну виживаності пацієнтів на ДКРЛ встановлена пряма статистично значуща залежність між терміном виживаності та рівнем експресії Ki-67. При поділі ДКРЛ на пухлини, що експресують Ki-67 $\geq 33\%$ та $< 33\%$, виявлена залежність з терміном загальної виживаності ($p < 0,05$) (див. рис.1).

Всі ДКРЛ мали позитивний до маркерів нейроендокринного фенотипу статус. Виражена експресія маркерів була в 61,5% (24/39), решта 38,5% (15/39) – помірну із забарвленням 33-66% ракових клітин. Не було виявлено залежності між групами дослідження за інтенсивністю експресії досліджених маркерів ДКРЛ. Так виражена реакція визначалась в 92,8 (13/14) Л-ДКРЛ та в 72,0% (18/25) ($\chi^2 = 2,3$, $p = 0,1$), що визначає тенденцію до меншого рівня експресії маркерів серед Р-ДКРЛ.

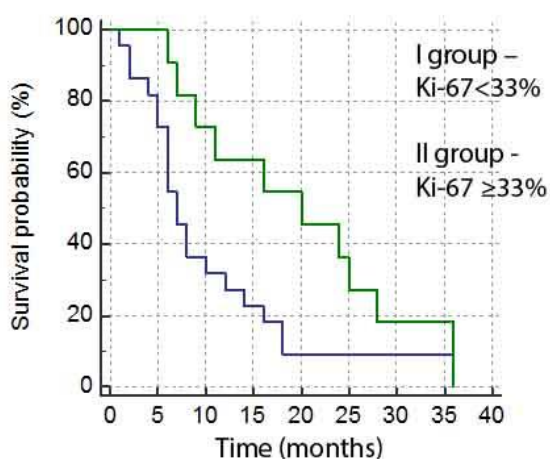


Рис.1. Загальна виживаність пацієнтів в залежності від рівня експресії Ki-67, ($\chi^2 = 4,1$, $p = 0,041$).

Позитивна реакція до CD44 визначалась в 30,7% (12/39) та була переважно слабкою з рівнем експресії маркеру вище за 1% ракових клітин.

При порівнянні рівня відносного числа експресуючих маркер ДКРЛ серед груп дослідження, встановлено відсутність залежності між позитивним CD44 статусом та приналежності пухлини до розповсюджені чи локалізованої форми при наявності тенденції до підвищення експресії маркера серед Р-ДКРЛ. Не виявлено також статистично значущої залежності між позитивною реакцією маркеру та терміном ЗВ пацієнтів ($p = 0,7$).

при наявності тенденції до підвищення експресії маркера серед Р-ДКРЛ. Не виявлено також статистично значущої залежності між позитивною реакцією маркеру та терміном ЗВ пацієнтів ($p = 0,7$).

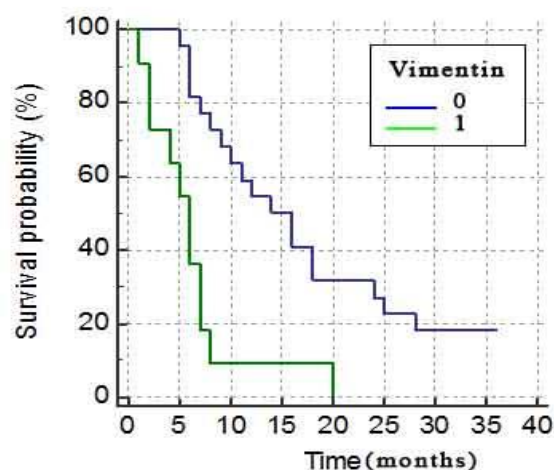


Рис.2. Загальна виживаність пацієнтів в залежності від позитивної (1) та негативної (0) експресії виментину ($\chi^2 = 13,5$, $p < 0,001$).

При оцінюванні коекспресії CD44 з дослідженими маркерами встановлено зворотну кореляційну залежність з нейроендокринним статусом ДКРЛ ($r = -0,65$, $p < 0,01$), а також тенденцію до зворотного зв'язку між рівнем експресії CD44 та Ki-67. Таким чином, чим більша проліферативна активність ДКРЛ, тим менша вірогідність наявності стовбурового фенотипу.

В досліджених ДКРЛ експресія панцитокератина була непостійною, часто слабкою, в окремих випадках ледь помітна зерниста перинуклеарна реакція близько 1% ракових клітин вважалась за негативну. Позитивна реакція до пан-

цитокератину спостерігалась в 69,2% (27/39) зі слабким рівнем експресії в 43,5% (17/39). Відсутня статистично значуща залежність між рівнем експресії ЦК та прогнозом захворювання.

При дослідженні коекспресії маркерів, не виявлено кореляційної залежності між реакцією панцитокератину та Ki-67 ($r=0,2$, $p>0,05$), панцитокератину та CD56 ($r=0,05$, $p>0,05$) та панцитокератину з CD44 ($r=0,06$, $p>0,05$).

Експресія віментину спостерігалася в 28,2% (11/39) ДКРЛ, з яких в 90,9% (10/11) реакція була слабкою у цитоплазмі до 33% ракових клітин.

Простежена тенденція до появи експресії віментину серед Р-ДКРЛ в порівнянні з Л-ДКРЛ. Лише один випадок з 14 Л-ДКРЛ мали експресію віментину, тоді як серед Р-ДКРЛ позитивна реакція досліджуваного маркера визначалась в 40% випадків (10/25). Проте отримані дані свідчать про відсутність статистично значущої залежності між Л-ДКРЛ та Р-ДКРЛ за рівнем експресії віментину.

Простежена залежність між рівнем експресії віментину та терміном літального наслідку пацієнтів ДКРЛ ($\chi^2 = 13,5$, $p < 0,001$) (див. рис. 2). Так середній термін виживаності пацієнтів без реакції ДКРЛ до віментину склав $16,9 \pm 2,2$ міс., при позитивній реакції – $6,2 \pm 1,7$ міс. ($p < 0,001$). Таким чином, можна вважати, що віментин є значущим маркером у визначенні клінічної поведінки та прогнозу ДКРЛ.

Простежено зворотну кореляційну залежність між експресією віментину раковими клітинами та Ki-67 ($r=-0,4$, $p<0,01$). Оцінка коекспресії маркерів показала, що при появі реакції віментину раковими клітина, спостерігалось зниження їх проліферативної активності, що в свою чергу є однією з ознак ЕМТ.

Простежена тенденція до зниження експресії CD56 при появі експресії віментину ДКРЛ. Ця зворотна залежність не набувала статистичної значущості ($r=0,3$, $p>0,05$).

Молекулярно-біологічною особливістю стала тенденція до прямої залежності між експресією віментину та CD44 ($r=0,13$, $p>0,05$).

Обговорення

Формування груп дослідження пацієнтів на ДКРЛ спиралось на загальноприйнятту у клінічній практиці класифікація Л-ДКРЛ та Р-ДКРЛ, що є навіть більш вживаним ніж класифікацію TNM [5]. Саме розподіл пухлин на ці групи має значення щодо лікувальної тактики пацієнтів. Так пацієнтам Л-ДКРЛ має бути призначена більш агресивне лікування [5], крім того, локалізація пухлини в межах однієї ділянки грудної клітини, включно лімфатичні вузли, дозволяє проводити променеви терапію [6].

Дані щодо прогностичного значення експресії Ki-67 ДКРЛ залишаються суперечливими. Якщо НДКРЛ відносно високий рівень проліферативної активності свідчить про більш агресив-

ну клінічну поведінку та несприятливий перебіг захворювання, то, за нечисленими науковими даними, високий рівень експресії Ki-67 ДКРЛ корелює з повною відповіддю до променевої терапії та, за окремими даними, більшим терміном виживаності [7, 8, 9] В цілому, отримані нами дані щодо впливу високого рівня проліферативної активності ДКРЛ на більш сприятливий перебіг захворювання збігається з даними світової літератури.

Також в ході даної роботи було надано оцінку низки іншим імуногістохімічних маркерам щодо прогнозу перебігу ДКРЛ. Встановлено обмежене прогностичне значення таких маркерів як: панцитокератину, CD44, маркерів нейроендокринного фенотипу CD56 та синаптофізину.

В науковій літературі наведені окремі дані стосовно особливостей експресії цих маркерів та їх ролі у перебігу і прогресії ДКРЛ. Існують свідчення, що вказують на науковий інтерес вивчення особливостей появи стовбурового фенотипу ДКРЛ, зокрема експресії CD44. За даними Wang Y. et al., 2021 [10] високий рівень експресії CD44 корелює з гіршим загальним статусом (poor performance status) та коротшою без рецидивною виживаністю пацієнтів на ДКРЛ. Проте отримані нами дані не дозволяють вважати маркер CD44 значущим прогностичним критерієм ДКРЛ.

В даному дослідженні надано оцінку не лише окремих ІГХ маркерів ДКРЛ, але і їх коекспресії, що дозволило виявляти прогностичне значення відповідних молекулярно-біологічних критеріїв та реалізацію процесів епітеліально-мезенхімальної трансформації та стовбурового фенотипу ракових клітин, як загально біологічних явищ, що обумовлюють біологічну та клінічну поведінку пухлин.

Так в нашому матеріалі серед ДКРЛ з позитивною експресією віментину часто спостерігалось зниження реакції до панцитокератину. Оцінка коекспресії цих маркерів вказує на тенденцію до зворотної залежності ($r=-0,27$, $p>0,05$). Отримані дані свідчать про процеси ЕМТ, в ході якого віментин, що є мікрофіламентом цитоскелету клітин мезенхімального гістогенезу, заміщує цитокератини, що складають цитоскелет клітин епітеліального походження. Також встановлено зниження проліферативної активності ДКРЛ при появі реакції віментину раковими клітина, що в свою чергу також є однією з ознак ЕМТ [11].

Отримані дані кореляційної залежності експресією віментину та CD44 надають підстави вважати взаємозалежними явища появи стовбурового та мезенхімального імунофенотипів ДКРЛ, що також супроводжується втрачанням тканино-специфічних маркерів, зокрема маркерів нейроендокринних тканин CD56 та синаптофізину.

Отримані результати реалізації сигнальних

шляхів ЕМТ та стовбурового фенотипу ДКРЛ представляють науковий та практичний інтерес та потребує подальше дослідження.

Висновки

Встановлені прогностичні критерії ДКРЛ щодо загальної виживаності, приналежності до стадії локалізованого чи розповсюдженого процесу (Л-ДКРЛ та Р-ДКРЛ).

1. Високий рівень експресії Ki-67 є сприятливим прогностичним критерієм. Доведено, що рівень проліферативної активності Р-ДКРЛ нижчий ніж Л-ДКРЛ ($p < 0,001$). Також встановлена пряма статистично значуща залежність між терміном виживаності та рівнем експресії Ki-67.

2. Віментин є значущим маркером біологічної поведінки та прогнозу ДКРЛ. Встановлена кореляційна залежність до меншого терміну ЗВ пацієнтів на ДКРЛ серед випадків з позитивною експресією віментину ($p < 0,001$).

3. Мають обмежене прогностичне значення: низка клініко-морфологічних ознак, дані гістологічних характеристик ДКРЛ, експресія панцитокератину, CD44, маркерів нейроендокринного фенотипу (CD56 та синаптофізін) раковими клітинами.

4. Встановлено зворотну кореляційну залежність між нейроендокринним статусом ДКРЛ

та позитивною реакцією до CD44, що слід пояснювати процесами втрати тканинної специфічності ракових клітин при появі молекулярно-біологічних свідчень стовбурового фенотипу. Встановлена також тенденція до прямої залежності між появою експресії раковими клітинами віментину та ознаками стовбурового фенотипу – експресії CD44, а також зворотної залежності з експресією CD56 – маркеру нейроендокринних тканин.

Перспективи подальших досліджень

Формування та удосконалення алгоритмів діагностики та вибору оптимальної лікувальної тактики у пацієнтів з ДКРЛ на різних стадіях захворювання.

Інформація про конфлікт інтересів

Потенційних або явних конфліктів інтересів, що пов'язані з цим рукописом, на момент публікації не існує та не передбачається.

Джерела фінансування

Дослідження проведено в рамках науково-дослідної роботи «Патогістологічна та імуногістохімічна діагностика і прогноз злоякісних пухлин різної локалізації з урахуванням їх біологічних властивостей та клінічного перебігу» (номер державної реєстрації 0117U000594).

Літературні джерела References

1. Lokuhetty D (2021), WHO Classification of Tumours Editorial Board. Thoracic tumours. (5th ed.; vol. 5) (pp. 29 -36, 139-143) Lyon (France): International Agency for Research on Cancer. <https://publications.iarc.fr/595>

2. Raso MG, Bota-Rabassedas N, Wistuba II. Pathology and Classification of SCLC. *Cancers*. 2021; 13(4):820. <https://doi.org/10.3390/cancers13040820>

3. Yang S, Zhang Z, Wang, Q. Emerging therapies for small cell lung cancer. *Journal Of Hematology & Oncology*. 2019; 12(1):11. <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0736-3>

4. Wang L, Dou X, Liu T, Lu W, Ma Y, Yang Y. Tumor size and lymph node metastasis are prognostic markers of small cell lung cancer in a Chinese population. *Medicine*. 2018; 97 (31): e11712. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000011712>

5. Wender R., Fontham E., Barrera E, et al. American Cancer Society lung Cancer screening guidelines. *CA Cancer J Clin*. 2013; 63: 106-117.

6. Murrell DH, Karnas SJ, Corkum MT, Hipwell S, Palma DA, Rodrigues G, Louie AV. Radical radiotherapy for locally advanced non-small cell lung cancer-what's up with arm positioning? *J Thorac Dis*. 2019 May;11(5):2099-2104. doi: 10.21037/jtd.2019.05.40.

7. Ishibashi N, Maebayashi T, Aizawa T,

Sakaguchi M, Nishimaki H, Masuda S. Correlation between the Ki-67 proliferation index and response to radiation therapy in small cell lung cancer. *Radiat Oncol*. 2017 Jan 13;12(1):16. doi: 10.1186/s13014-016-0744-1.

8. Wang D, Ye W, Shi Q. Prognostic Value of Ki-67 Expression in Advanced Lung Squamous Cell Carcinoma Patients Treated with Chemotherapy. *Cancer Manag Res*. 2021; 13: 6429-6436 <https://doi.org/10.2147/CMAR.S326189>

9. Seba BS, Coskun D1, Sevda C, Nestrin K, Elif TP, Ali F, Nagehan OB, Sule K. The importance of Ki-67 proliferation index in small cell lung cancer. *Gul European Respiratory Journal*. 2020; 56: 1732. DOI: 10.1183/13993003.congress-2020.1732

10. Wang Y, Guo Y, Lin H, Zhang L, Zhang H, Wang Q, Hu F, Li J, Li B, Zhang T. Expression of CD44 in Tumor Tissue and Serum of Small Cell Lung Cancer and Its Clinical Prognostic Significance. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*. 2021 Aug 20;24(8):583-590. doi: 10.3779/j.issn.1009-3419.2021.104.10.

11. Peng H, Tan X, Wang Y, Dai L, Liang G, Guo J, et al.. Clinical significance of Ki-67 and circulating tumor cells with an epithelial-mesenchymal transition phenotype in non-small cell lung cancer. *Am J Transl Res*. 2020; 12:2916–28. 10.2147/CMAR.S251271

Яковцова І.І., Янчевський О.В. Окремі клініко-морфологічні та імуногістохімічні критерії прогнозу дрібноклітинного раку легень.

РЕФЕРАТ. Актуальність. Дрібноклітинний рак легені (ДКРЛ) є однією з найбільш агресивних гістологічних форм РЛ, що потребує комбінованої променевої та хіміотерапії та ранній стадії пухлинного процесу. Визначення імуногістохімічних (ІГХ) критеріїв клінічної поведінки ДКРЛ є критичним щодо індивідуалізованої тактики лікування пацієнтів. **Мета** дослідження: вдосконалення морфологічних критеріїв прогнозу перебігу ДКРЛ на підставі дослідження клініко-морфологічних та молекулярно-біологічних характеристик первинних пухлин. **Методи.** Були обрані випадки ДКРЛ хірургічно видалених та після автопсії померлих пацієнтів. Сформовані групи дослідження: I локалізовані ДКРЛ (Л-ДКРЛ) та II розповсюджені форми (Р-ДКРЛ). Було враховано термін з моменту встановлення діагнозу до смерті пацієнтів. Проведено ІГХ дослідження первинних пухлин з визначенням експресії маркерів: Ki-67, CD56, синаптофізін, панцитокератин, віментин та CD44. **Результати та підсумок.** Встановлено, що рівень проліферативної активності Р-ДКРЛ нижчий ніж Л-ДКРЛ ($p < 0,001$), визначено пряму статистично значущу залежність між терміном виживаності та рівнем експресії Ki-67, що характеризує маркер Ki-67 як критерій сприятливого прогнозу ДКРЛ. Встановлена кореляційна залежність до меншого терміну загальної виживаності (ЗВ) пацієнтів на ДКРЛ серед випадків з позитивною експресією віментину ($p < 0,001$). Поява ІГХ свідчень процесів епітеліально-мезенхімальної трансформації ДКРЛ супроводжується тенденцією до появи стовбурового імунофенотипу ракових клітин та частковою втратою нейроендокринного статусу пухлини.

Ключові слова: дрібноклітинний рак легень, епітеліально-мезенхімальна трансформація, стовбуровий фенотип.

**Шоста Всеукраїнська конференція
«ТЕОРІЯ ТА ПРАКТИКА СУЧАСНОЇ МОРФОЛОГІЇ»
(9-11 листопада, м. Дніпро, Україна)**



Шоста Всеукраїнська конференція «Теорія та практика сучасної морфології», яка відбулася на базі Дніпровського державного медичного університету на початку листопада 2022 року, привернула увагу всієї наукової морфологічної спільноти нашої держави та багатьох провідних фахівців іноземних закладів.

На думку організаторів конференції, цей науковий форум став потужним інтеграційним вектором, що викарбувався останніми роками та об'єднав зусилля фахівців з усіх напрямів сучасної морфології. Надзвичайно важливо утримати цей вектор саме під час тяжких випробувань, яких протягом багатьох місяців зазнає наша країна.

Керівники двох ключових національних фахових об'єднань – Наукового товариства морфологів України (професор Олена Аппельханс, м. Одеса) і Асоціації патологів України (професор Валерій Туманський, м. Запоріжжя) – у своїх вітальних промовах зазначили велику роль нашої конференції у формуванні фундаментальних і клінічних досліджень, а також окреслили сьогоденні світові тенденції розвитку морфології та основні шляхи його реалізації в Україні.

Уповодж двох днів до доповідей визнаних морфологів українських і закордонних установ була прикута увага делегатів із понад 150 кафедр і підрозділів різних навчальних, наукових і лікувальних закладів. Зацікавлення виявили сотні фахівців з усіх куточків вільної України, а у день, коли ЗСУ довершували визволення її правобережної частини, до форуму долучилися навіть науковці з Херсона!

На завершальному засіданні голова оргкомітету професор Ігор Твердохліб узагальнив здобутки наукового заходу, висловив вдячність всім його організаторам і учасникам, визначив основні позиції резолюції, а також запросив до участі у наступній Сьомій конференції «Теорія та практика сучасної морфології» у Дніпрі.

Повний відеозапис конференції опублікований за посиланнями:

<https://www.youtube.com/watch?v=v-wIHTMODkw> (перший день);

https://www.youtube.com/watch?v=XgQKbIe_fWQ&t=110s (другий день).

Основні матеріали заходу – на його офіційному сайті:

<https://sites.google.com/a/dsma.dp.ua/confmorphology/materiali-konferenciie/konferencia-2022-roku>.

Рецензії, відгуки, презентації Reviews, comments, presentations

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2022.4.48-53>

Войцех Павліна, Майкл Г. Росс. Гістологія: підручник і атлас. З основами клітинної та молекулярної біології: 8-е видання: у 2 томах / Пер. з англ. Том 2. Київ : ВСВ «Медицина». 2021. 624 с.

ISBN 978-617-505-903-6 (9786175059036)

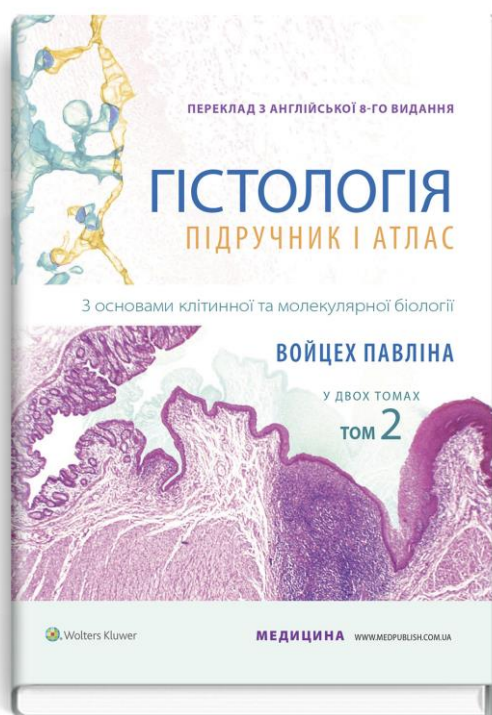
Автори:

Войцех Павліна – доктор медицини, член Американської асоціації анатомів, професор анатомії та медичної освіти, член Американської асоціації анатомів, завідувач кафедри анатомії, Коледж медицини і науки Клініки Мейо, Рочестер, Міннесота, США; **Майкл Г. Росс** – доктор філософії, професор, почесний завідувач кафедри анатомії та клітинної біології, коледж медицини університету Флориди, Гейнсвілл, Флорида, США.

Наукові редактори перекладу:

Олександр Степаненко – доктор медичних наук, професор, завідувач кафедри гістології, цитології та ембріології Харківського національного медичного університету;

Юрій Чайковський – доктор медичних наук, професор, завідувач кафедри гістології та ембріології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця, член-кореспондент НАМН України.



Два фундаментальних навчальних джерела з гістології в одній книзі!

Цей легкий для читання і багатий на повнокольорові ілюстрації бестселер поєднує комплексний сучасний підручник із гістології (з основами клітинної та молекулярної біології) та повний атлас мікрофотографій високої якості. Лаконічний і зрозумілий виклад текстового матеріалу допомагає швидко знайти та опрацювати потрібну інформацію і разом із яскравими ілюстраціями сприяє чіткому розумінню взаємозв'язку гістології з клінічними дисциплінами, нормальною фізіологією і біохімією на основі цільових концепцій та клінічних паралелей, а також дає образне детальне уявлення про структурну організацію та функції клітин, тканин і органів.

• **Оновлений і доповнений матеріал розділів**, присвячених міжклітинним контактам, синтезу еластичних волокон, питанню мінералізації кісткової тканини тощо, дає змогу зрозуміти принципи молекулярної та клітинної біології на основі сучасної, клінічно орієнтованої інформації.

• **Понад 100 ілюстративних блоків** у цьому виданні складаються із 435 повнокольорових цифрових мікрофотографій з високою роздільною здатністю, що допомагає чітко визначити на них основні гістологічні структури.

- **Оновлені повнокольорові ілюстрації підручника і клінічні фотографії** сприяють кращому розумінню деталей мікроскопічної будови тканин й органів, а також клітинної та молекулярної біології.
 - **Оновлено частини «Гістологія 101»** наприкінці кожного розділу підручника, які містять стислий опис основної інформації, викладеної в тексті розділу, у стилі студентського конспекту, що дає змогу перевірити засвоєння матеріалу вдома або скористатися ними під час виконання групового навчального завдання в рамках аудиторної роботи.
 - **Виділений кольором текст** привертає увагу читача до ключових термінів і клінічної інформації, сприяючи швидкому пошуку потрібних відомостей і продуктивнішому опрацюванню теми.
 - **Виділені окремими блоками «Додатки»** знайомлять читача з різними патологічними процесами, які можуть виникати у клінічній практиці. Додано нові матеріали з мікрографічної хірургії за методом Моса, а також дані про найпоширеніші захворювання слизової оболонки носової порожнини.
 - **Текст, структурований у вигляді таблиць і маркованих списків**, допомагає швидко узагальнити важливу інформацію, наприклад, про методи забарвлення гістологічних препаратів.
- Книга призначена для студентів медичних факультетів закладів вищої освіти, лікарів-інтернів, викладачів, науковців, фахівців-практиків.

ЗМІСТ

13. Серцево-судинна система

Серцево-судинна система: загальна характеристика

Серце

Загальні особливості артерій і вен

Артерії

Капіляри

Артеріовенозні шунти

Вени

Атипові кровеносні судини

Лімфатичні судини

Додаток 13.1. Клінічні паралелі: атеросклероз

Додаток 13.2. Клінічні паралелі: гіпертензія

Додаток 13.3. Клінічні паралелі: ішемічна хвороба серця

Гістологія 101

Ілюстрації (атлас)

Ілюстрація 32. Серце

Ілюстрація 33. Аорта

Ілюстрація 34. Артерії м'язового типу (середнього калібру) і вени, що їх супроводжують

Ілюстрація 35. Артеріоли, венули і лімфатичні судини

14. Імунна система і лімфоїдні тканини та органи

Імунна і лімфоїдна системи: загальна характеристика

Клітини імунної системи

Лімфоїдні тканини та органи

Додаток 14.1. Функціональні міркування: походження назв Т- і В-лімфоцитів

Додаток 14.2. Клінічні паралелі: реакції гіперчутливості

Додаток 14.3. Клінічні паралелі: вірус імунодефіциту людини та синдром набутого імунодефіциту

Додаток 14.4. Клінічні паралелі: реактивний (запальний) лімфаденіт

Гістологія 101

Ілюстрації (атлас)

Ілюстрація 36. Піднебінний мигдалик

Ілюстрація 37. Лімфатичний вузол I

Ілюстрація 38. Лімфатичний вузол II

Ілюстрація 39. Селезінка I

Ілюстрація 40. Селезінка II

Ілюстрація 41. Тимус

15. Загальний покрив

Загальний покрив: загальна характеристика

Шари шкіри

Клітини епідермісу

Інші компоненти шкіри

Додаток 15.1. Клінічні паралелі: рак епідермального походження

Додаток 15.2. Клінічні паралелі: мікрографічна хірургія за методом Мооса
Додаток 15.3. Функціональні міркування: колір шкіри
Додаток 15.4. Функціональні міркування: ріст волосся та його характеристики
Додаток 15.5. Клінічні паралелі: потовиділення та його порушення
Додаток 15.6. Клінічні паралелі: відновлення шкіри

Гістологія 101

Ілюстрації (атлас)

Ілюстрація 42. Шкіра I

Ілюстрація 43. Шкіра II

Ілюстрація 44. Апокринні та мерокринні потові залози

Ілюстрація 45. Потові та сальні залози

Ілюстрація 46. Органи чуття у шкірі

Ілюстрація 47. Волоссяний фолікул і ніготь

16. Травна система I: ротова порожнина і пов'язані з нею структури

Травна система: загальна характеристика

Ротова порожнина

Язик

Зуби та їх підтримувальний апарат

Слинні залози

Додаток 16.1. Клінічні паралелі: генетичні основи відчуття смаку

Додаток 16.2. Клінічні паралелі: класифікація постійних (вторинних) і молочних (первинних) зубів

Додаток 16.3. Клінічні паралелі: карієс зубів

Додаток 16.4. Клінічні паралелі: пухлини слинних залоз

Гістологія 101

Ілюстрації (атлас)

Ілюстрація 48. Губа

Ілюстрація 49. Язик I

Ілюстрація 50. Язик II - листоподібні сосочки і смакові бруньки

Ілюстрація 51. Піднижньощелепна залоза

Ілюстрація 52. Привушна залоза

Ілюстрація 53. Під'язикова залоза

17. Травна система II: стравохід, шлунок, тонка кишка і товста кишка

Стравохід, шлунок, тонка кишка і товста кишка: загальна характеристика

Стравохід

Шлунок

Тонка кишка

Товста кишка

Додаток 17.1. Клінічні паралелі: перніціозна анемія і пептична виразка

Додаток 17.2. Клінічні паралелі: синдром Золлінгера-Еллісона

Додаток 17.3. Функціональні міркування: ендокринна система травного каналу

Додаток 17.4. Функціональні міркування: травна й абсорбційна функції ентероцитів

Додаток 17.5. Функціональні міркування: імунні функції травного каналу

Додаток 17.6. Клінічні паралелі: особливості розподілу лімфатичних судин та захворювання товстої кишки

Додаток 17.7. Клінічні паралелі: колоректальний рак

Гістологія 101

Ілюстрації (атлас)

Ілюстрація 54. Стравохід

Ілюстрація 55. Стравохід і кардіальна частина шлунка

Ілюстрація 56. Шлунок I

Ілюстрація 57. Шлунок II

Ілюстрація 58. Перехід шлунка у дванадцятипалу кишку

Ілюстрація 59. Дванадцятипала кишка

Ілюстрація 60. Порожня кишка

Ілюстрація 61. Клубова кишка

Ілюстрація 62. Ободова кишка

Ілюстрація 63. Червоподібний відросток

Ілюстрація 64. Анальний канал

18. Травна система III: печінка, жовчний міхур і підшлункова залоза

Печінка

Жовчний міхур
Підшлункова залоза
Додаток 18.1. Клінічні паралелі: ліпопротеїни
Додаток 18.2. Клінічні паралелі: хронічна серцева недостатність, передозування ацетамінофену і некроз печінки
Додаток 18.3. Клінічні паралелі: секреція інсуліну та хвороба Альцгеймера
Додаток 18.4. Функціональні міркування: синтез інсуліну (приклад посттрансляційної модифікації)
Гістологія 101
Ілюстрації (атлас)
Ілюстрація 65. Печінка I
Ілюстрація 66. Печінка II
Ілюстрація 67. Жовчний міхур
Ілюстрація 68. Підшлункова залоза

19. Дихальна система

Дихальна система: загальна характеристика
Носова порожнина
Глотка
Гортань
Трахея
Бронхи
Бронхіоли
Альвеоли
Кровообігання
Лімфатичні судини
Нерви
Додаток 19.1. Клінічні паралелі: загальні умови, що впливають на слизову оболонку носової порожнини
Додаток 19.2. Клінічні паралелі: плоскоклітинна метаплазія епітелію дихальних шляхів
Додаток 19.3. Клінічні паралелі: астма
Додаток 19.4. Клінічні паралелі: кістозний фіброз
Додаток 19.5. Клінічні паралелі: хронічне обструктивне захворювання легень і пневмонія
Гістологія 101
Ілюстрації (атлас)
Ілюстрація 69. Нюхова слизова оболонка
Ілюстрація 70. Гортань
Ілюстрація 71. Трахея
Ілюстрація 72. Бронхіоли і кінцеві респіраторні відділи
Ілюстрація 73. Термінальна бронхіола, респіраторна бронхіола та альвеоли

20. Сечова система

Сечова система: загальна характеристика
Загальна будова нирки
Функція ниркових трубочок
Інтерстиційні клітини
Гістофізіологія нирки
Кровообігання
Відтік лімфи
Іннервація
Сечовід, сечовий міхур і сечівник
Додаток 20.1. Функціональні міркування: нирки і вітамін D
Додаток 20.2. Клінічні паралелі: гломерулонефрит, індукований антитілами проти клубочкової базальної мембрани; синдром Гудпашера
Додаток 20.3. Клінічні паралелі: ренін-ангіотензин-альдостеронова система та артеріальна гіпертензія
Додаток 20.4. Клінічні паралелі: дослідження сечі
Додаток 20.5. Функціональні міркування: структура і функція аквапоринових водних каналів
Додаток 20.6. Функціональні міркування: функції збірних проток та їх регуляція антидіуретичним гормоном
Гістологія 101
Ілюстрації (атлас)
Ілюстрація 74. Нирка I
Ілюстрація 75. Нирка II
Ілюстрація 76. Нирка III

Ілюстрація 77. Нирка IV

Ілюстрація 78. Сечовід

Ілюстрація 79. Сечовий міхур

21. Ендокринні органи

Ендокринна система: загальна характеристика

Гіпофіз

Гіпоталамус

Шишкоподібна залоза (епіфіз)

Щитоподібна залоза

Прищитоподібні залози

Надниркові залози

Додаток 21.1. Функціональні міркування: регуляція секреції гормонів гіпофіза

Додаток 21.2. Клінічні паралелі: причини розвитку ендокринних захворювань

Додаток 21.3. Клінічні паралелі: патології, зумовлені порушенням секреції антидіуретичного гормону

Додаток 21.4. Клінічні паралелі: порушення функції щитоподібної залози

Додаток 21.5. Клінічні паралелі: хромафінні клітини і феохромоцитома

Додаток 21.6. Функціональні міркування: біосинтез гормонів надниркових залоз/400

Гістологія 101

Ілюстрації (атлас)

Ілюстрація 80. Гіпофіз I

Ілюстрація 81. Гіпофіз II

Ілюстрація 82. Шишкоподібна залоза

Ілюстрація 83. Прищитоподібні та щитоподібна залози

Ілюстрація 84. Надниркова залоза I

Ілюстрація 85. Надниркова залоза II

22. Чоловіча статева система

Чоловіча статева система: загальна характеристика

Яечко

Сперматогенез звивисті сім'яні трубочки

Інтрастестикулярні протоки

Система сім'яносних проток

Додаткові статеві залози

Передміхурова залоза

Сперма

Статевий член

Додаток 22.1. Функціональні міркування: гормональна регуляція сперматогенезу

Додаток 22.2. Клінічні паралелі: чинники, що впливають на сперматогенез

Додаток 22.3. Клінічні паралелі: спермієспецифічні антигени та імунна відповідь

Додаток 22.4. Клінічні паралелі: доброякісна гіпертрофія передміхурової залози та рак простати

Додаток 22.5. Клінічні паралелі: механізм ерекції та еректильної дисфункції

Гістологія 101

Ілюстрації (атлас)

Ілюстрація 86. Яечко I

Ілюстрація 87. Яечко II

Ілюстрація 88. Виносні протоки і над'яечко

Ілюстрація 89. Сім'яний канатик і сім'явивідна протока

Ілюстрація 90. Передміхурова залоза

Ілюстрація 91. Пухирчаста залоза

23. Жіноча репродуктивна система

Жіноча репродуктивна система: загальна характеристика

Яечник

Маткові труби

Матка

Плацента

Піхва

Зовнішні статеві органи

Грудні залози

Додаток 23.1. Клінічні паралелі: полікістоз яєчників

Додаток 23.2. Клінічні паралелі: екстракорпоральне запліднення

Додаток 23.3. Функціональні міркування: гормональна регуляція оваріального циклу

Додаток 23.4. Клінічні паралелі: плацента
Додаток 23.5. Клінічні паралелі: цитологічне дослідження шийки матки (Pap-тест)
Додаток 23.6. Клінічні паралелі: рак шийки матки і папіломавірусна інфекція
Додаток 23.7. Функціональні міркування: лактація і функціональне безпліддя
Гістологія 101
Ілюстрації (атлас)
Ілюстрація 92. Яєчник I
Ілюстрація 93. Яєчник II
Ілюстрація 94. Жовте тіло
Ілюстрація 95. Маткова труба
Ілюстрація 96. Матка I
Ілюстрація 97. Матка II
Ілюстрація 98. Шийка матки
Ілюстрація 99. Плацента I
Ілюстрація 100. Плацента II
Ілюстрація 101. Піхва
Ілюстрація 102. Грудна залоза в неактивному стані
Ілюстрація 103. Грудна залоза, пізня проліферативна і лактаційна фази

24. Орган зору

Орган зору: загальна характеристика
Загальна будова ока
Мікроскопічна будова ока
Додаткові структури ока
Додаток 24.1. Клінічні паралелі: глаукома
Додаток 24.2. Клінічні паралелі: відшарування сітківки
Додаток 24.3. Клінічні паралелі: вікова макулярна дегенерація
Додаток 24.4. Клінічні паралелі: клінічна візуалізація сітківки
Додаток 24.5. Клінічні паралелі: колірна сліпота
Додаток 24.6. Клінічні паралелі: кон'юнктивіт
Гістологія 101
Ілюстрації (атлас)
Ілюстрація 104. Око I
Ілюстрація 105. Око II: сітківка
Ілюстрація 106. Око III: передній сегмент
Ілюстрація 107. Око IV: склера, рогівка і кришталик

25. Орган слуху

Орган слуху: загальна характеристика
Зовнішнє вухо
Середнє вухо
Внутрішнє вухо
Додаток 25.1. Клінічні паралелі: отосклероз
Додаток 25.2. Клінічні паралелі: втрата слуху - вестибулярна дисфункція
Додаток 25.3. Клінічні паралелі: запаморочення
Гістологія 101
Ілюстрації (атлас)
Ілюстрація 108. Вухо
Ілюстрація 109. Завиткова протока і спіральний орган

ДО ВІДОМА АВТОРІВ

Загальні вимоги

Дана інформація складена на основі «Єдиних вимог до рукописів, що подаються в біомедичні журнали», з якими автори можуть ознайомитися детальніше на сайті <http://www.ICMJE.org>.

Журнал «Morphologia» публікує оглядові і проблемні статті, лекції, оригінальні статті, короткі повідомлення, рецензії та відгуки на публікації, посібники і монографії, матеріали з методології наукових досліджень, анонси, новини, повідомлення, презентації, а також матеріали з хроніки та історії в галузі морфології.

Редакція розглядає матеріали публікацій з дотриманням [авторських прав](#) і [етичних норм наукової публікації](#).

Редакція приймає матеріали, які надаються українською або англійською мовами.

При поданні рукопису автори повинні урахувати та розкрити потенційні конфлікти інтересів або чітко заявити про їх відсутність (більш детальну інформацію можна знайти в розділі «D. Конфлікт інтересів» [«Єдиних вимог до рукописів, що подаються в біомедичні журнали»](#)).

За наявності в рукописі інформації, що ідентифікує особу учасників дослідження, слід надати їх письмовий дозвіл на публікацію.

У рукописах має бути чітко позначена відповідність принципам біоетики, що викладені в [Декларації Хельсінкі](#) та Законі України [«Про захист тварин від жорстокого поводження»](#) (№ 1759-VI від 15.12.2009) або в аналогічних документах національного рівня інших держав.

Технічні вимоги до рукопису

Обсяг оглядової, проблемної статті або лекції повинен становити від 12 до 36 сторінок машинопису, оригінальної статті від 8 до 24 сторінок, включаючи ілюстративний матеріал, інших матеріалів за узгодженням з редакцією.

Текст друкується через 1,5 інтервали, розмір шрифту 14, гарнітура Times New Roman. Відступ абзацу 10 мм. Береги з усіх боків по 20 мм.

Стаття повинна бути виконана у форматі RTF або «документ Microsoft Word».

Структура рукопису:

- УДК
- Назва статті (без аббревіатур)
- Автор(и): ініціали, прізвище
- ORCID ідентифікатори авторів
- E-mail відповідального автора
- Офіційна назва установи, місто (для кожного автора)
 - Дані про зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами, фондами, інституціями, грантами (за їх наявності)
- Реферат українською та англійською мовами.
- Текст статті

Реферат до статті (правила оформлення)

Реферати українською та англійською мовами потрібно надавати обсягом від 1800 до 2200 знаків та структурувати за такими рубриками: назва статті, прізвища та ініціали авторів, їх місце роботи, актуальність (Background), мета

(Objective), методи (Methods), результати (Results), підсумок або висновки (Conclusion), ключові слова (Key words).

У зв'язку з обробкою метаданих кожної статті журналу наукометричними базами звертаємо увагу авторів на особливу важливість ретельного оформлення назв установ і прізвищ авторів, так як від цього залежить успішність їх ідентифікації та розрахунку наукометричних показників.

У тексті оригінальної статті варто додержуватись послідовності обов'язкових складових:

- Вступ
- Мета
- Матеріали та методи
- Результати та їх обговорення
- Підсумок (або висновки)
- Перспективи подальших розробок
- Літературні джерела (див. Додаток)

У тексті статті всі фізичні величини та одиниці слід наводити за SI, терміни згідно з анатомічною та гістологічною номенклатурами, назви хвороб за діючою Міжнародною класифікацією хвороб, лікарські препарати за Міжнародними непатентованими назвами (INN).

Всі скорочення при їх першому згадуванні повинні бути розшифровані. Використання скорочень у назві статті та рефераті не дозволяється.

Посилання на першоджерела в тексті статті треба здійснювати наведенням у квадратних дужках порядкового номера у списку літературних джерел. Можливе також посилання у вигляді: «...на думку І.І. Іванова та співавторів [8],

R.T. Smith з колегами [12]...». Посилання на кілька першоджерел у тексті статті розділяються таким чином: «...[2, 4, 6-8]».

Стаття може містити діаграми, графіки та таблиці, що побудовані внутрішніми засобами редактора MS Word. Для позначення приміток рекомендовано використовувати наступні елементи у відповідній послідовності: *, †, ‡, §, ||, ¶, **, ††, ‡‡. Фотоілюстрації подаються в електронному варіанті окремими файлами у форматі JPEG або TIFF; роздільна здатність має складати не менше ніж 150 точок на дюйм. У тексті статті рисунки потрібно розташовувати після першого посилання на них, підписи до рисунків наводити мовою оригіналу статті й обов'язково англійською.

Рукопис повинен бути ретельно відредагований авторами. Всі статті підлягають процедурі рецензування.

Для первинної експертизи рукопис і відомості про авторів (установи, посади, наукові ступені та вчені звання авторів) потрібно надсилати за адресою: morphology@dsma.dp.ua.

У разі прийняття статті на цю ж адресу надсилається відсканована копія «Авторської згоди» з підписом відповідального автора.

Додаток

Літературні джерела (правила і приклади оформлення списку)

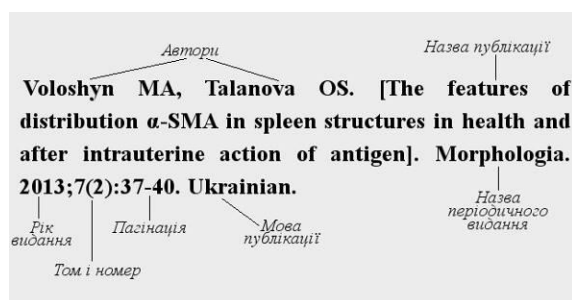
Всі літературні посилання, які наведені в роботі, обов'язково повинні бути представлені в списку першоджерел у порядку використання (посилань) у тексті. Скорочення назв журналів наводяться згідно зі стандартами Index Medicus (http://www.wsulibs.wsu.edu/general/journal_abbreviations.html). За достовірність даних, наведених у бібліографічному списку, відповідає автор.

Кожне використане бібліографічне джерело має бути позначене у тексті статті (у квадратних дужках). Посилання на неопубліковані роботи або матеріали на правах рукопису (дисертації, автореферати) не допускаються.

Кожне джерело у списку необхідно оформлювати у форматі міжнародного стандарту Vancouver reference style (NLM/PubMed). У разі наявності в мережі Інтернет електронної копії цитованого документа бажано в кінці бібліографічного посилання розміщувати URL адресу документа; за наявності слід також вказувати DOI або PMID статті. При оформленні посилань на періодичні видання, що мають кілька варіантів назви, слід віддавати перевагу англійській.

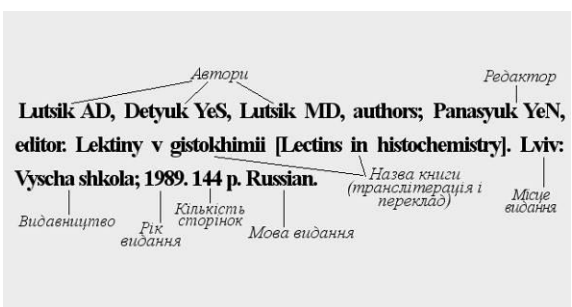
Коротка інструкція по оформленню типових літературних посилань відповідно до міжнародних вимог [Vancouver reference style \(NLM/PubMed\)](#).

Оформлення посилання на статтю, опубліковану в періодичному виданні:



Необхідно вказувати всіх авторів, відокремлювати їх один від одного комою і пробілом. Ініціали вказуються після прізвища, знаками пунктуації не розділяються. Повні імена авторів не наводяться. Після переліку авторів ставиться крапка і пробіл. Назва публікації наводиться англійською мовою у квадратних дужках. Після назви статті ставиться крапка і пробіл. Для статті англійською мовою назва вказується без квадратних дужок. Назва періодичного видання наводиться англійською мовою або транслітерацією назви символами латинського алфавіту. Допускається наводити зареєстроване скорочення назви періодичного видання. Після назви видання ставиться крапка і пробіл. Інформація про видання: рік видання відокремлюється крапкою з комою, потім наводиться номер тому, в круглих дужках вказується номер журналу, після двокрапки приводиться діапазон сторінок. Для статті, що опублікована не англійською мовою, в кінці сформованого посилання вказується мова оригіналу. Додаткова інформація про статтю номери DOI PubMed ID та ін.

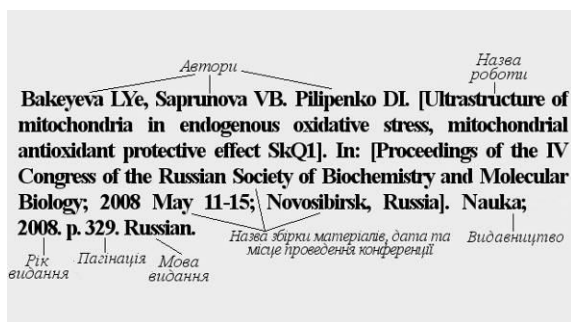
Оформлення посилання на книгу:



Необхідно вказувати всіх авторів, відокремлювати їх один від одного комою і пробілом. Ініціали вказуються після прізвища, знаками пунктуації не розділяються. Повні імена авторів не наводяться. Автори першого і другого порядків розділяються крапкою з комою і пробілом. Автори другого порядку редактори, перекладачі. Після переліку авторів ставиться крапка і пробіл. Назва книги: наводиться транслітерація назви

книги і/або переклад назви книги англійською мовою в квадратних дужках. Якщо книга видана англійською мовою, назва її в квадратні дужки не береться. Після назви книги ставиться крапка і пробіл. Номер видання (у форматі 1st, 2nd, 3rd, 4th тощо), додаткова інформація про видання: виправлене (rev.), доповнене (enl.), стереотипне (repr.) та інш. Зверніть увагу перше видання вказується тільки в тому випадку, якщо достовірно відомо про подальші перевидання і Ви цитуєте саме перше видання. Місце видання вказується місто, в круглих дужках за необхідності вказується країна. Після зазначення місця публікації ставиться двокрапка і пробіл. Видавництво наводиться транслітероване латиницею або його англійська назва. Після видавництва ставиться крапка з комою і пробіл. Рік видання, після вказівки його ставиться крапка і пробіл. Обсяг книги в сторінках (наприклад, 568 p.), після зазначення його ставиться крапка і пробіл. Для книги, що опублікована не англійською мовою, в кінці посилання вказується мова оригіналу.

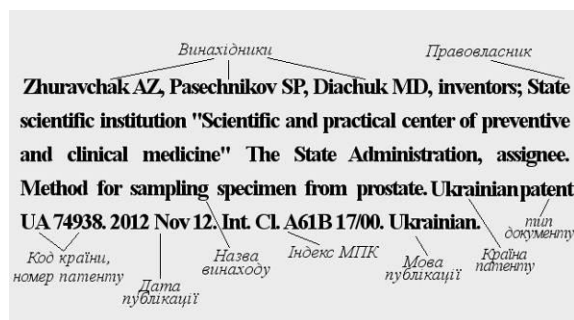
Оформлення посилання на матеріали конференції:



Необхідно вказувати всіх авторів, відокремлювати їх один від одного комою і пробілом. Ініціали вказуються після прізвища, знаками пунктуації не розділяються. Повні імена авторів не наводяться. Після переліку авторів ставиться крапка і пробіл. Назва публікації наводиться англійською мовою у квадратних дужках. Після назви статті ставиться крапка і пробіл. Для матеріалів англійською мовою назва вказується без квадратних дужок. Сполучна фраза «In:». Назва збірника матеріалів конференції, а також назва конференції наводяться англійською мовою у квадратних дужках. Для матеріалів, що видавались англійською мовою, дужки не ставляться.

Після назви ставиться крапка і пробіл. Слід зазначити максимально повні відомості про конференцію дати проведення, місце проведення та ін. Видавництво зазначається місто видання і назва видавництва транслітерацією латиницею або англійською назвою. Після зазначення видавництва ставиться крапка з комою і пробіл. Рік видання, після нього ставиться крапка і пробіл. Діапазон сторінок, після нього ставиться крапка і пробіл. Для матеріалів, що опубліковані не англійською мовою, в кінці сформованого посилання вказується мова оригіналу.

Оформлення посилання на патент:



Необхідно вказувати всіх авторів, відокремлювати їх один від одного комою і пробілом. Ініціали вказуються після прізвища, знаками пунктуації не розділяються. Повні імена авторів не наводяться. Після переліку авторів ставиться кома і зазначається *inventor* або *inventors*, ставиться крапка з комою і пробіл. Правовласник вказується ім'я (правила аналогічні таким для винахідників) або назва організації, потім після коми вказується *assignee*, потім ставиться крапка точка і пробіл. Наводиться назва винаходу, після нього ставиться крапка і пробіл. Вказується країна реєстрації, а також тип документу (патент), код країни і номер патенту. Всі елементи розділяються пробілами, наприкінці ставиться крапка і пробіл. Вказується дата публікації інформації про видачу патенту, потім крапка з пробілом. Індекс (індекси) Міжнародної патентної класифікації наводяться після *Int. Cl.*, Якщо їх більше одного розділяються крапкою з комою. Після зазначення всіх індексів ставиться крапка і пробіл. Для матеріалів, виданих не англійською мовою, в кінці сформованого посилання вказується мова оригіналу.

Адреса редакції: 49005, Україна, м. Дніпро, вул.Севастопольська, 19.
 Редакція журналу «Morphologia».
 Тел.: 0974584284.
 E-mail: morphology.iyt@gmail.com

AUTHOR GUIDELINES

General requirements

This information is based upon the "Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals" which authors can find online www.ICMJE.org.

Journal «Morphologia» publishes reviews and topical articles, lectures, original papers, case reports, review and comments on publications, manuals and monographs, materials in research methodology, announcements, news, reports, presentations, and materials on the history and chronicles in morphology.

Editorial office examines materials of publications in compliance with [copyright](#) and [ethical norms](#). Editorial Board accepts the materials written in English and Ukrainian languages.

When submitting a manuscript, authors should

consider and disclose potential [conflicts of interest](#) or clearly state their absence (more information can be found in section «D. Conflicts of Interest» of the "[Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals](#)").

In the case when submitted manuscript contains personally identifiable information of study participants authors should provide their written permission to publish such materials.

In the manuscripts should be clearly indicated compliance with the principles of bioethics set in the [Declaration of Helsinki](#) and in the Law of Ukraine "[About protection of animals from violent behavior](#)" (№ 1759 -VI 15 Dec 2009) or equivalent documents of the national level of other countries.

Technical requirements for the manuscripts

Size of Review, critical articles or lectures should be from 12 up to 36 typewritten pages, original articles from 8 up to 24 pages, including illustrations, other publications on consideration with the editorial office.

The text is printed with 1.5 line spacing, font size 14, Times New Roman. Paragraph indent 10 mm, all margins 20 mm.

Article must be done in RTF or «document Microsoft Word».

The structure of the manuscript:

- UDC
- Title of the article (no abbreviations)
- Author (s): initials, surname
- ORCID identifier of every author
- e-mail of the responsible author
- The official name of the institution (affiliation), the city
- Data about communication of publication with the planned research project, foundation source, institutions, grants (if available)
- Summary in English language
- Text of the article

Abstract of the article

(Design rules)

Extended abstract (from 1800 up to 2200 symbols) in English should be submitted with next mandatory elements: title of the article, Family name and first names of all authors, their affiliations, the actuality of research (Background), purpose (Objective), methods (Methods), results (Results), conclusions (Conclusion), keywords (Key words).

Because of the processing of the metadata of each article by scientometric databases authors

should pay especial attention to the particular importance of careful designation of names of institutions and authors, as it affects the success of their identification and calculation by scientometric indicators.

In the text of the original article authors should follow the sequence of mandatory components:

- o Background
- o Purpose
- o Materials and Methods
- o Results and discussion
- o The conclusion (or conclusions)
- o Prospects for further investigations
- o References (see Appendix)

In the text of the article all the physical units should be given in system SI, terms according to the anatomical and histological nomenclature, names of diseases according to the current International Classification of Diseases, drugs at the International Nonproprietary Name (INN).

All abbreviations at their first mention must be decrypted. Use of abbreviations in the title and abstract is not allowed.

A citation of the original documents in the text of the manuscript should be implemented in square parentheses indicating the sequence number in the list of references. Acceptable also to cite as: according to I.I.Ivanova et al. [8], RT Smith and colleagues [12]. Citations of several primary sources in the text should be separated as follows: [2, 4, 6-8]".

Article may contain diagrams, graphs and tables constructed by internal means of MS Word. To denote footnotes, it is recommended to use the elements in the following order: *, †, ‡, §, ||, ¶, **, ††, ‡‡. Photoillustrations are submitted electronically as

separate files in JPEG or TIFF with minimal resolution 150 dpi. The text of the article should include drawings after the first reference to them, figure captions need to be done in the original language and in English mandatory.

The manuscript should be carefully edited by the authors. All articles are subjected to peer [review procedure](#).

For primary expertise manuscript and information about the author (affiliation, position, scientific degrees and academic titles of authors) should be sent to e-mail at: morphology@dsm.dp.ua. In case of article acceptance a scanned copy of the "[Copyright Agreement](#)" with the signature of the responsible author is sent to editorial office.

Appendix

References (Rules and examples of the list)

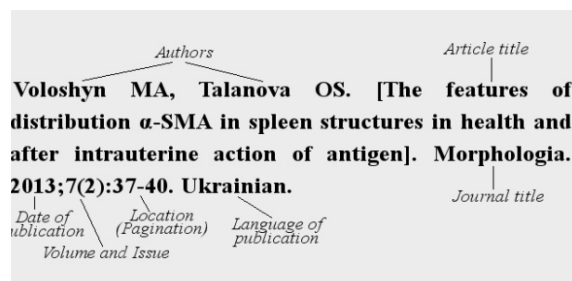
All references cited in the paper must be arranged in a list in order of their first mentioning in the text. Abbreviations of journal titles are provided in accordance with the standards of [Index Medicus](#). The author is responsible for the accuracy of the data provided in the bibliography.

Each used bibliographic source must be designated in the text (in square parentheses). References to unpublished work or materials as a manuscript (dissertations, reports) are not allowed.

Each source in the list should be composed an international standard format [Vancouver reference style \(NLM/PubMed\)](#). In case of presence of the electronic copy of the cited document in the Internet, it is desirable to place the URL of the document at the end of the reference, also indicate the DOI and PMID of the article if it is available. When citing periodicals, with more than one title, preference should be given to English one.

Quick start guide on the arrangement of standard references in accordance with international requirements of [Vancouver reference style](#).

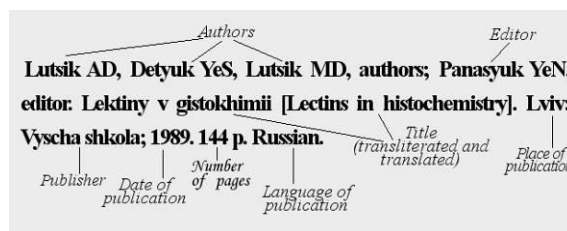
Reference to an article published in a periodical:



All authors should be indicated, separate them with a comma and a space. Initials are placed after the surnames, they are not separated by punctuation. Full names of the authors are not given. After the list

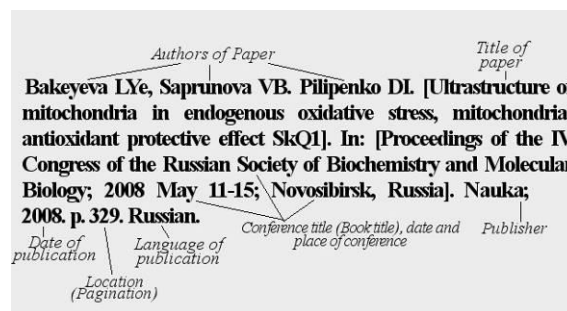
of authors put a dot and a space. Article title written in English is given in square parentheses. After the title of the article put a dot and a space. For publications originally written in English title is not placed in square parentheses. Indicate journal title in English or by transliteration with symbols of the latin alphabet. It is possible to use the registered abbreviation of the periodical title. The title of the journal is preceded by a point and a space. Publication Information: year of publication separated by a semicolon, and then the volume number, the number of issue, placed in parentheses and after them put the colon and pagination. Additional information about the article DOI, PubMed ID, and so on could be added at the end.

Reference to a book:



All authors should be indicated, separate them with a comma and a space. Initials are placed after the surnames, they are not separated by punctuation. Full names of the authors are not given. The authors of the first and second range are separated by semicolon. The authors of the second range editors, translators. After the list of authors put a dot and a space. Book title: original name in English or transliteration/translation with the symbols of latin alphabet in square parentheses. After book title there is a dot and a space. Number of issue (in format 1st, 2nd, 3rd, 4th), additional information about issue reviewed (rev.), enlarged (enl.), representational (repr.) etc. The first edition is mentioned only in case of assured existence of more than one editions of this book. Place of publication specify the city and if it is important country in parentheses. After specifying the place of publication there is a colon and a space. Publisher indicated in Latin transliteration or in its English name. After publisher there is a semicolon and a space. Year of publication, after pointing it put a dot and a space.

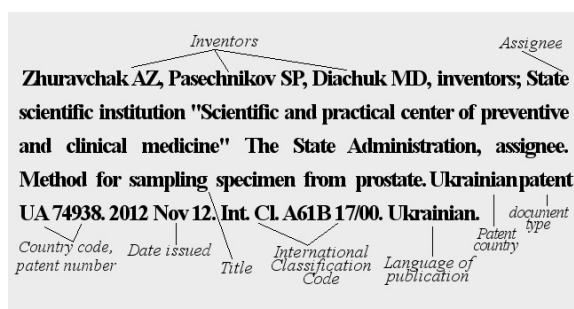
Reference to a conference materials:



All authors should be indicated, separate them with a comma and a space. Initials are placed after the surnames, they are not separated by punctuation. Full names of the authors are not given. After the list of authors put a dot and a space. Publication title written in English is given in square parentheses. For publications originally written in English title is not placed in square parentheses. After the title of the publication put a dot and a space. Connecting phrase «In:». Name of the conference written in English in square parentheses. For the conferences originally named in English the name is not placed in square parentheses. After the title, put a dot and a space. The most comprehensive data about the conference should be indicated dates, place and so on. Publisher the city of the publication and publisher name transliterated with Latin alphabet or English name. After specifying a publisher put a semicolon and a space. Year of publication with a dot and a space. For materials published not in English, at the end of the reference indicate the original language.

All authors should be indicated, separate them with a comma and a space. Initials are placed after the surnames, they are not separated by punctuation. Full names of the authors are not given. After list of authors (inventors) put the coma and word 'inventor' or 'inventors', then the semicolon and space. Assignee put the name of person (the same rules as for the inventor) or the name of organization, then put coma and the word 'assignee', than dot and space. The title of the invention; put a dot and a space after it. Index(es) of the International Patent Classification given after Int. Cl., If more than one separated by a semicolon. After specifying all the indices put a dot and a space. For materials not published in English at the end of the reference indicates the original language.

Reference to a patent:



Address of the editorial office: 49005, Ukraine, Dnipro, Sevastopolska str., 19.
 Editorial office of the journal «Morphologia».
 Tel.: +380974584284.
 E-mail: morphology.ivt@gmail.com



Handwritten text in a cursive script, likely Latin, located below the anatomical drawing. The text is oriented horizontally but appears to be a mirror image of the original, suggesting it was written on the reverse side of the page and is now visible through the paper. The text is dense and covers several lines.