

О.О. Ошивалова<sup>1,2</sup>  
Л.Д. Калюжна<sup>2</sup>  
І.С. Шпонька<sup>3</sup>  
О.В. Пославська<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Державна наукова установа «Науково-практичний центр профілактичної та клінічної медицини» Державного управління справами, Київ

<sup>2</sup> Національна медична академія післядипломної освіти імені П.Л. Шупика, Київ

<sup>3</sup> Державний заклад «Дніпропетровська медична академія Міністерства охорони здоров'я України»

Надійшла: 09.07.2019

Прийнята: 14.09.2019

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2019.3.7-21>

УДК:616.517-03-007.61-091.8/-097-076.5/-079.4

## ІМУНОГІСТОХІМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ВОГНИЩ АКТИНІЧНОГО КЕРАТОЗУ

Oshivalova O.O.  , Kaluzhna L.D., Shponka I.S. , Poslavska O.V.  Immunohistochemical features of actinic keratosis.

State Scientific Institution "Scientific and Practical Centre of Preventive and Clinical Medicine" of the State Administration, Kyiv, Ukraine

Shupyk National Medical Academy of Postgraduate Education, Kyiv, Ukraine

State Institution "Dnipropetrovsk Medical Academy of the Ministry of Health of Ukraine", Dnipro, Ukraine


**ABSTRACT. Background.** Skin damage by type of actinic keratosis (AK) and squamous cell carcinoma in situ (SCCis) are considered to be precursors to cSCC. A common theory about the gradual transition from normal skin to AK and cSCC. Some scientists believe that AK is the same cancer as cSCC. **Objective.** To investigate the complex of histological, immunohistochemical characteristics of observations of areas of AK, SCCis and cSCC with the purpose of further improvement of preventive measures. **Methods.** Bioassays of 20 (50%) patients with AK were used, 10 (25%) were SCCis, and 10 (25%) were cSCCs. The levels of epidermal dysplasia (KIN) have been determined. Light microscopy was performed with a Zeiss Primo Star light microscope using  $\times 10$ ,  $\times 20$ ,  $\times 40$  lenses, and a morphometric examination was performed using a Zeiss Primo Star microscope camera - Axiocam ERC 5s with ZEN 2 blue edition licensed software. Statistical processing of the material was performed using Microsoft Office Excel software. **Results.** When comparing the expression levels of the investigated markers in the AK foci, the "cancer field" and the SCC, a significant difference occurred only in the expression level of pcna ( $p = 0.014$  and  $p = 0.011$ ). With the increase in the level of dysplasia of the epidermis there is a tendency to increase the level of bcl-2 ( $R2 = 0.815$ ), p53 ( $R2 = 0.744$ ) vegf mean ( $R2 = 0.680$ ). Trends in increasing pcna and vegf levels against the background of decreasing levels of bcl-2, p53, and p27 in the SCC zone ( $R2 = 1.0$ ). **Conclusion.** The study confirms the scientific opinion about the closeness of immunohistochemical changes in the focus of AK and cSCC.


**Key words:** actinic keratosis, cutaneous squamous cell carcinoma, cell cycle, apoptosis pathways, carcinogenesis.


### Citation:


Oshivalova OO, Kaluzhna LD, Shponka IS, Poslavska OV. [Immunohistochemical features of actinic keratosis]. Morphologia. 2019;13(3):7-21. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2019.3.7-21>

 Oshivalova O.O. 0000-0002-0395-0269

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

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

 oshivalovaea@gmail.com

© SI «Dnipropetrovsk Medical Academy of the Ministry of Health of Ukraine», «Morphologia»

## Вступ

Плоскоклітинний рак шкіри (cSCC – cutaneous squamous cell carcinoma) є другим найбільш поширеним злоякісним ураженням шкіри з рівнем захворюваності більш ніж 250 000 випадків вперше діагностованих випадків на рік [1]. Пошкодження шкіри по типу актинічного кератозу (AK- actini skeratosis) та плоскоклітинного раку in situ (SCCis - squamous cell carcinoma in situ), які найбільш важко диференціювати і які представлені дисплазією кератиноцитів різного ступеня, вважаються попередниками cSCC [2]. Хоча деякі науковці вважають, що АК насправді є cSCC і повинен розглядатися як рак [3, 4]. Проте, існує думка, що відмінності між АК і cSCC має важливе значення, так як впливає на вибір лікувальної тактики і має прогностичні відмінності для пацієнта [2, 3].

Відомо декілька досліджень, в яких вивчали диференціальну експресію генів у біозразках нормальної шкіри, АК і cSCC [5-8]. При надмірній дії УФО можливе пошкодження ДНК і мутації, що призводить до утворення АК, а потім cSCC [9]. Широко поширена теорія про ступеневий перехід від нормальної шкіри до АК та cSCC [11, 12]. Хоча більшість науковців підтримують цю модель багатоступеневого канцерогенезу, є вчені, які вважають, що АК таке ж ракове ураження, як cSCC, а не його попередник [4]. Це твердження підтверджується дослідженнями, які показали відсутність диференційовано виражених генів між АК і cSCC [7]. Однак додаткове профілювання більше 47 000 генів показало, що і АК, і cSCC має свій власний унікальний молекулярний підпис [10]. Хоча АК і cSCC мають аналогічні профілі експресії генів і тісно пов'язані між собою на молекулярному рівні, було виявлено дев'ять генів, які свідчать про диференційовану генетичну детермінантність кожного із них [10].

Клітинний цикл еукаріот складається з двох періодів. Перший період - період клітинного росту (інтерфаза), під час якого йде синтез ДНК і білків і здійснюється підготовка до поділу клітини. Інтерфаза складається з декількох стадій:

- G1-фази (від англ. Gap - проміжок), або фази початкового росту, під час якої йде синтез мРНК, білків, інших клітинних компонентів;
- S-фази (від англ. Synthesis - синтез), під час якої йде реплікація ДНК клітинного ядра, також відбувається подвоєння центріолей (якщо є).
- G2-фази, під час якої йде підготовка до мітозу.

Диференційовані клітини, які більше не діляться, знаходяться у фазі спокою G0 (маючи

стільки ж ДНК, як в G1).

Другий період - період клітинного ділення (фаза М, від слова mitosis - мітоз) (рис. 1) [3].

Проліферація клітин, що відбувається шляхом мітозу, жорстко регулюється безліччю молекулярних сигналів. Скоординована діяльність цих численних регуляторів клітинного циклу забезпечує як перехід клітин від фази до фази клітинного циклу, так і точне виконання подій кожної фази. Порушення ж такої скоординованої діяльності призводять як до спотворень проходження клітини по фазах клітинного циклу (патологія мітозу), так і до втрати контролю за проліферативними потенціями клітини, що може привести до безконтрольної її проліферації - появи неконтрольованого клону, тобто до пухлинного росту [10-12]. Головна причина появи проліферативно неконтрольованих клітин - мутації генів, що кодують структуру власних регуляторів клітинного циклу [13].

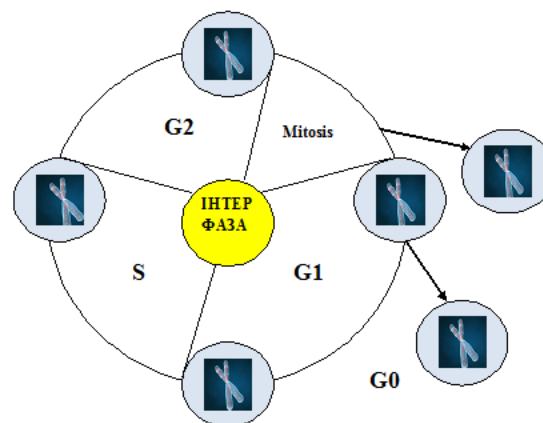


Рис. 1. Клітинний цикл еукаріот (Ra S.H., Li X., Binder S. Molecular discrimination of cutaneous squamous cell carcinoma from actinic keratosis and normal skin. Modern Pathology. 2011;24:963–973).

Існують спеціальні речовини, що пригнічують розвиток пухлин - онкосупресори, які в нормальній клітині постійно контролюють безліч процесів, в тому числі і проліферацію клітин. Відомо безліч онкосупресорів, наприклад, Rb, p27, p53, PTEN, серед яких p53 відомий як головний супресор розвитку пухлини. Мутації генів онкосупресорів неминуче призводять до появи безконтрольно проліферируючого клітинного клону [14].

Дослідження показали, що еволюція cSCC від нормальної шкіри передбачає участь багатьох різних молекулярних шляхів. Сигнальний p53 шлях був широко залучений в онкогенез cSCC. Білок p53 - один з найважливіших регуляторів клітинного циклу, специфічно зв'язується з ДНК і пригнічує ріст клітин в фазі G1. p53 реєструє

різні сигнали при зовнішніх впливах на клітину (вірусна інфекція, гіпоксія) і стан її геному (активація онкогенів, пошкодження ДНК) [15].

Відомо, що високий рівень нормального білка p53 викликає тимчасову затримку або навіть арешт клітинного циклу в двох критичних точках: на кордоні G1 / S-переходу і на кордоні G2 / M. Накопичення білка p53 у відповідь на ДНК-пошкоджуючі агенти корелює з одночас-

ним виникненням блоку проліферації G1 і в G2 фазах клітинного циклу, хоча необхідно відзначити, що G2 блок може виникати і у відсутності p53. Одна з гіпотез полягає в тому, що еукаріотичні клітини затримуються в G1 і G2 фазах клітинного циклу в відповідь на пошкодження ДНК для того, щоб провести репарацію до початку синтезу ДНК або входу в мітоз (рис. 2) [16, 17].

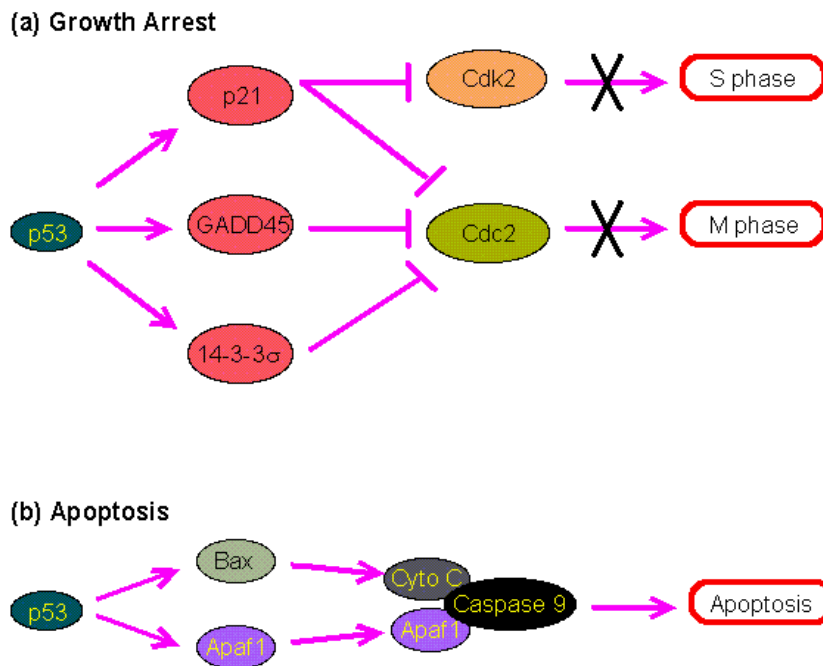


Рис. 2. Вплив білка p53 на клітинний цикл (BenjaminCL, MelnikovaVO, AnanthaswamyHN. P53 protein and pathogenesis of melanoma and nonmelanoma skin cancer. Adv Exp Med Biol. 2008;624:265–282).

Активация нормального p53 агентами, які пошкоджують ДНК, а також гіпоксією призводить до зупинки клітинного циклу у фазі G1 і індукції відновлення ДНК шляхом підвищення транскрипції p21 (CDKN1A) і гена GADD45. Успішне відновлення ДНК дозволяє клітинам знову входити в мітотичний цикл; якщо відновлення ДНК не вдало, p53 ініціює апоптоз або старіння клітини. У клітинах з втратою або мутаціями p53 зупинки клітинного циклу або відновлення ДНК при її пошкодженні не відбувається, генетично пошкоджені клітини проліферують і піддаються в кінцевому рахунку злоякісної трансформації [16]. p53-індукована репресія генів шляхом активації мікроРНК. p53 активує транскрипцію mir34 сімейства мікроРНК. mir34 пригнічує транскрипцію як проліферативних генів, наприклад циклінів, так і антиапоптозних генів, наприклад Bcl-2 [16].

Слід підкреслити, що ген p53 називають «стражем геному», тому що він забезпечує взаємозв'язок між ушкодженням і його усуненням ДНК, вихід клітини з мітотичного циклу і її апоптоз. Близько 50% пухлин людини асоційовані з мутацією в цьому гені. Гомозигот-

на втрата p53 відбувається практично у всіх видах злоякісних пухлин, включаючи карциноми легені, товстої кишки і молочної залози - три лідируючі онкологічні причини летального результату [15].

Клітинний цикл контролюється точними механізмами запобігання злоякісних новоутворень, таких як рак, і клітина потребує цих жорстких і передових засобів контролю. p27 відіграє багатогранну роль в регуляції клітинної проліферації і клітинної міграції. Інгібітор циклінзалежної кінрази p27 (також відомий як KIP1) є фактором, який пригнічує прогресування клітинного циклу з використанням специфічних молекулярних механізмів [1]. p27 (Kip1) (p27) пов'язує і пригнічує циклін E або циклін A-асоційовані циклінзалежної кінрази (CDK) 2 та інші CDK і негативно регулює прогресування клітинного циклу G1-G2 [2].

На рис. 3 представлена схема, яка підсумовує вплив зниження рівня p27, що спостерігається у багатьох різних типів пухлин людини, на прогресування злоякісності пухлини. Під впливом онкогенних подразників зниження синтезу p27 індукує дерегуляцію експресії генів,

які беруть участь у клітинних функціях, та полегшує придбання пухлинною злоякісних властивостей. Зокрема, шляхом дерегуляції генів, що беруть участь в окисному фосфорилуванні та проліферації клітин, гени, що кодують хемокіни

та їх рецептори і гени, що беруть участь у створенні спеціальних метастатичних ніш, зниження рівня p27 сприяє прогресуванню злоякісних пухлин [18].

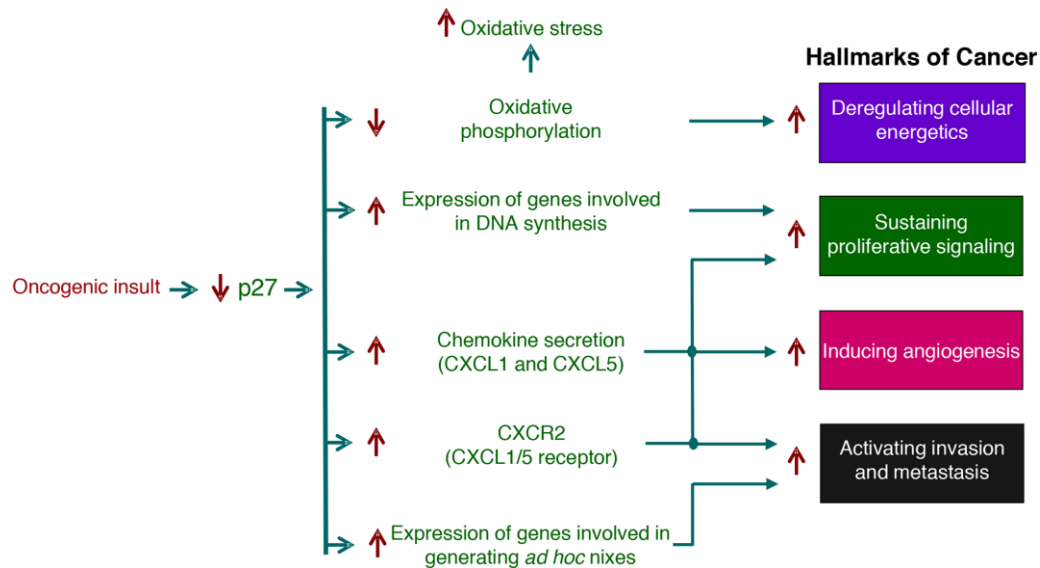


Рис. 3. Роль транскрипційної регуляторної функції p27 при розвитку раку (O. Vachs, E. Gallastegui, S. Orlando, A. Bigasetal. Role of p27<sup>Kip1</sup> as a transcriptional regulator. *Oncotarget*. 2018;9(40):26259–26278).

Пригнічення клітинного циклу є ядерною функцією p27. При багатьох ракових захворюваннях не тільки знижується p27 в ядрі, але і в пухлинах також проявляється різна ступінь цитоплазматичної неправильної локалізації p27. Цитоплазматичний p27 набуває незалежну від клітинного циклу онкогенну функцію та сприяє інвазії ракових клітин [4]. Таким чином, в той час як ядерний p27 пригнічує CDK2 для обмеження клітинного циклу, надмірна цитоплазматична експресія p27 може надавати про-онкогенну дію, сприяючи інвазії раку і метастазуванню. Знижений ядерний p27 збільшує проліферацію, а цитоплазматичний p27 стимулюватиме інвазію пухлинних клітин [4].

З огляду на центральну роль p27 в клітинній проліферації і міграції, не дивно, що знижений або неправильно локалізований p27, підтверджений імуногістохімічним аналізом в первинних пухлинах, пов'язаний з поганим клінічним результатом при різноманітних злоякісних пухлинах людини [5]. Прогресуюча втрата p27 спостерігалася під час гістопатологічного прогресування неоплазії від доброякісної пухлини до *in situ* і інвазивного раку молочної залози [6,7]. Одне дослідження показало, що в порівнянні з нормальним епітелієм проток молочної залози, де 95% клітин демонструють високий ядерний p27, передракова атипова протокова гіперплазія демонструє помірну втрату p27 (85%), в той час як протокова карцинома *in situ* (40%) і інвазивний рак (34%) показують велику втрату p27 [7]. При раку

яєчників поразки з низьким злоякісним потенціалом показали проміжні рівні p27 в порівнянні з високими рівнями в нормальному епітелії, в той час як високо агресивні ракові захворювання показали дуже низький ядерний p27 [7,8].

Проліферуючий ядерний антиген клітини (PCNA - Proliferating Cell Nuclear Antigen) - ядерний негістоновий білок, необхідний для синтезу ДНК і є допоміжним білком для альфа-ДНК-полімерази, який підвищується під час фази G1 / S клітинного циклу. Спокійні і старечі клітини мають дуже низький рівень мРНК PCNA [19, 20]. Експресія PCNA може використовуватися як маркер проліферації клітин, оскільки клітини залишаються довше часу у фазі G1 / S при проліферації. Крім того, цей білок відіграє важливу роль у метаболізмі нуклеїнових кислот як компонента механізму реплікації та відновлення ДНК [21].

Підвищення рівня PCNA може бути викликане чинниками росту або внаслідок пошкодження ДНК за відсутності клітинного циклу [21, 22]. PCNA використовується для вимірювання активності проліферації клітин; чим вище активність проліферації, тим більша напруга між клітинами, що призводить до зниження адгезії і сприяє відокремленню пухлинних клітин від первинних уражень та метастазуванню [23]. Результати дослідження при злоякісному ураженні молочної залози показало [24], що позитивна швидкість експресії PCNA у ракових тканинах групи пацієнтів становила 42,2% і була значно



вище, ніж 2,5% у нормальних тканинах пацієнтів контрольної групи ( $p < 0,05$ ). Експресія PCNA в ракових тканинах групи пацієнтів була пов'язана з клінічною стадією та метастазами в лімфатичну клітину ( $p < 0,05$ ), але не мала кореляції з віком та розміром пухлини ( $p > 0,05$ ), що дозволяє припустити, що експресія PCNA тісно пов'язана з виникненням та розвитком раку молочної залози, що відповідає висновкам інших міжнародних медичних дослідників [25,26].

PCNA утворює комплекс з усіма комплексами CDK-циклінів, а також з критичними білками контрольної точки, продукуючи як позитивні (вказані стрілками), так і негативні сигнали (позначені як T-смути) [27]. Наукові спостереження дозволяють стверджувати, що PCNA є і перетворювачем, і мішенню для позитивних і негативних сигналів. Зв'язування PCNA з комплексами циклін-CDK може допомогти привести ці регуляторні білки до їх мішеней, тоді як порушення цих взаємодій конкурентним зв'язуванням p21 є сигналом для зупинки реплікації ДНК [28].

Багато генетичних відхилень, що лежать в основі малігнізації, такі як активація онкогенів і пошення функціонування генів супресії неконтрольованого зростання, можуть запустити ангиогенне переключення - трансформація клітин пухлини в ангиогенний фенотип [29,30]. Неопластичні судини не тільки починають кровопостачання первинної пухлини, але також підвищують ймовірність метастатичного розповсюдження ракових клітин по кровоносній системі [29].

Проангиогенні чинники, зокрема фактор росту ендотелію судин (VEGF – Vascular endothelial grow thfactor), експресуються переважно пухлинними клітинами і в меншій мірі клітинами навколишніх тканин, мігруючими макрофагами і фібробластами [31]. Неопластичний ангиогенез переважно опосередкований через VEGF-сигнальний шлях і включає взаємодію пухлинних і ендотеліальних клітин (рис.4) [30].

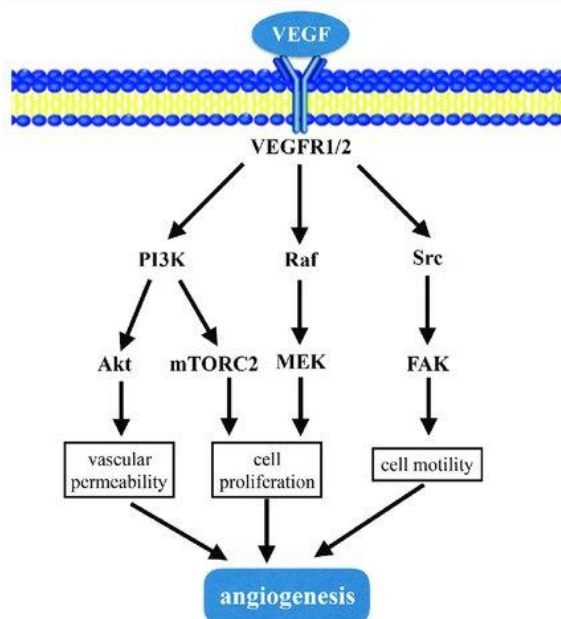


Рис.4. Сигнальний шлях VEGF, що бере участь в ангиогенезі (D. Guo, C. Murdoch, T. Liu, J. Qu. Therapeutic Angiogenesis of Chinese Herbal Medicines in Ischemic Heart Disease: A Review. Frontiers in Pharmacology. 2018;9:428).

Підвищена експресія VEGF клітинами пухлини може відігравати важливу роль в патогенезі злоякісних новоутворень, оскільки кровонаповнення є одним з визначальних чинників зростання пухлини. VEGF запускає неопластичний ангиогенез, в результаті зростає щільність мікросудин, і малігнізована тканина отримує більше поживних речовин. Секреція VEGF пухлинними клітинами призводить до ескалації синтезу проангиогенних чинників; оскільки VEGF запускає ангиогенез, нові судини починають постачати малігнізовану тканину киснем і поживними речовинами, пухлина росте і виробляє більшу кількість VEGF [32]. Крім того, VEGF за принципом позитивного зворотного зв'язку збільшує рівень експресії рецептора VEGFR2 ендотеліоцитами пухлинних мікросудин, що стимулює клітинний ріст і проліферацію ендотеліальних клітин [33].

В дослідженнях продемонстровано, що VEGF грає важливу роль в підтримці життєздатності новостворених неопластичних судин, особливо при дефіциті періцитів [34], тоді як низький рівень експресії VEGF призводить до апоптозу ендотеліальних клітин [35]. Періцити стабілізують стінки судин, а також впливають на проникність судин, проліферацію, життєздатність, міграцію і дозрівання ендотеліальних клітин. Зниження їх числа підвищує чутливість пухлинних судин до інгібіторів VEGF [34]. У присутності VEGF неопластична судинна мережа продовжує існувати за рахунок посилення експресії антиапоптотичних білків Bcl-2, XIAP, Bcl-A1, сурвівіна [36,37]. Таким чином, протягом усього часу розвитку пухлини інтенсивність утворення нових судин залежить від рівня синтезу VEGF [37].

Сімейство білків Bcl-2 відіграє значну роль у регуляції клітинного циклу. Він відіграє вирішальну роль у регулюванні гомеостазу, допомагаючи підтримувати належну кількість клітин та усуває потенційно злоякісні клітини [38]. Сімейство Bcl-2 має стратегічні контрольні пункти як на внутрішньому, так і на зовнішньому шляху, які можуть контролювати, чи знає клітина апоптоз (рис.5) [39].

25 ідентифікованих на даний момент членів сімейства білків Bcl-2 локалізовані в мітохондріях, гладкому ендоплазматичному ретикулумі та перинуклеарних мембранах у ге-

мопоетичних клітинах [40]. Родина білків Bcl-2 відіграє центральну роль у регуляції загибелі клітин і бере участь у регулюванні механізмів загибелі клітин, включаючи апоптоз, некроз та аутофагію. [41] Антиапоптотичні члени цього сімейства, такі як Bcl-SL та Bcl-W, запобігають апоптозу, або запобігаючи вивільнення мітохондріальних апоптогенних факторів, або секвеструють форми смертельних цистеїнових протеаз, званих каспазами [42].

Перенапруження антиапоптотичного білка, Bcl-2, з порушенням регулювання c-myc стимулює проліферацію незрілих В-клітин та пухлиногенез. [43]. Однак експресія Bcl-2 підтримує виживання клітини, не збільшуючи проліферацію клітин. Зрештою, експресія Bcl-2 призводить до збільшення кількості плазматичних клітин, попередніх В-клітин і Т-клітин, що демонструють збільшення довговічності в культурах [44].

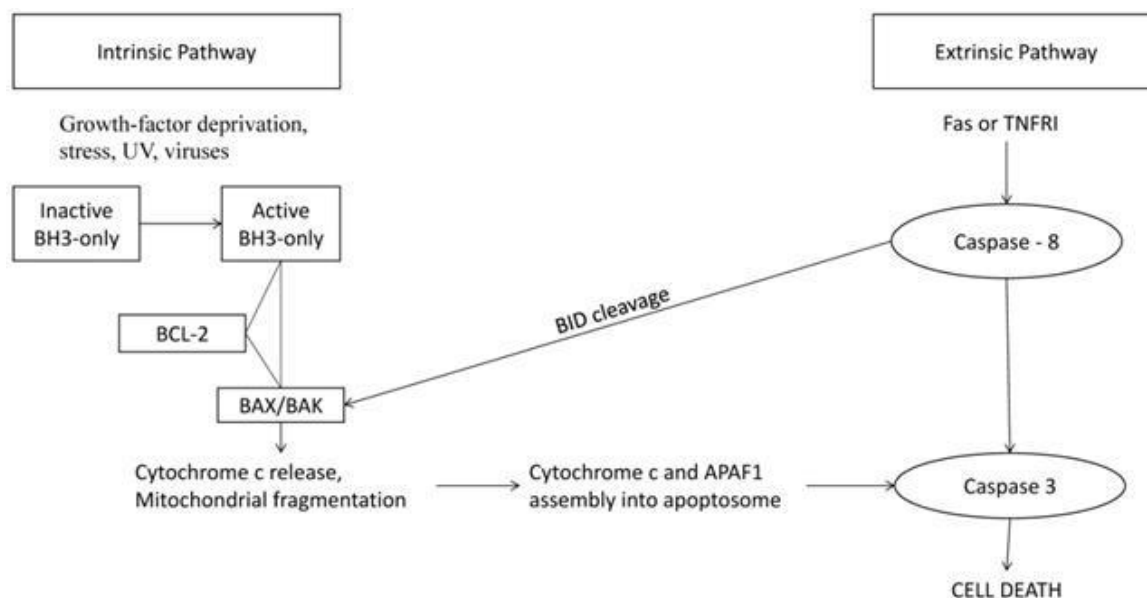


Рис. 5. Внутрішній і зовнішній шлях, який призводить до загибелі клітин (Youle R.J., Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2008;9:47-59).

Багато досліджень виявили, що в АК вже активовано декілька шляхів онкогенезу, які активовані і у cSCC, що підтверджує припущення, що АК є попередником ураження cSCC. Ці шляхи включають шляхи NFκB1 і TNF. З іншого боку, онкогенні шляхи RAS та MYC, схоже, спеціально активовані в cSCC [45]. Результати досліджень також свідчать про те, що рання активація протоонкогенних шляхів розвитку cSCC може запропонувати можливості для цілеспрямованого профілактичного втручання щодо АК і SCCis, які можуть протидіяти впливу «поля канцеризації» [45].

#### Мета

Дослідити комплекс гістологічних, імуногістохімічних характеристик спостережень ділянок актиничного кератозу в комплексі із молекулярно-генетичними порушеннями, порівняно із плоскоклітинною карциномою *in situ* та інвазивною плоскоклітинною карциномою, для вдосконалення діагностично-лікувальних заходів.

#### Матеріали та методи

Дослідження виконано в Державній науковій установі «Науково-практичний центр профілактичної та клінічної медицини» Держав-

ного управління справами (ДНУ «НПЦ ПКМ» ДУС) сумісно із Державним закладом «Дніпропетровська медична академія Міністерства охорони здоров'я України».

**Характеристика пацієнтів.** В нашому дослідженні було використано біопсійний післяопераційний матеріал 40 пацієнтів з ЕДШ, із них 20 (50%) пацієнти з АК, 10 (25%) пацієнти з SCCis і 10 (25%) пацієнт з cSCC. Статевікова характеристика хворих, залучених до дослідження, представлена в таблиці 1.

Таблиця 1  
Статевікова характеристика хворих з епідермальними дисплазіями шкіри

Тип ЕДШ	Стать пацієнтів	Кількість пацієнтів за статтю		Середній вік пацієнтів M±m, років
		абс.	%	
АК (n=20)	чол.	15	75	77,7±3,3
	жін.	5	25	75,2±4,2
SCCis (n=10)	чол.	5	50	78,2±3,4
	жін.	5	50	77,4±3,1
cSCC (n=10)	чол.	9	90	79,0±3,6
	жін.	1	10	78,0

Всього (n=40)	чол.	29	72,5	78,1±6,4
	жін.	11	27,5	76,9±7,3

Статистично достовірних відмінностей в групах пацієнтів АК iSCCis/cSCC по складу за статтю, віком хворих виявлено не було (p>0,05).

*Характеристика біозразків.* Першу групу дослідження (Гр1) склали біопрепарати хворих АК, другу досліджувану групу (Гр2) склали біопрепарати хворих SCCis і третю досліджувану групу (Гр3) склали біопрепарати пацієнтів з cSCC. За результатами гістологічних досліджень було визначено рівні дисплазії епідермісу (KIN-keratinocyte intraepidermal neoplasia) відповідно до запропонованої С. Cockerell і J. Wharton

класифікацією: KINI – легка ступінь (характеризується атипією клітин базального і супрабазального шарів у вигляді збільшення ядер в розмірі, їх гіперхромності), KINII – середня (відрізняється проліферацією атипичних кератиноцитів на 2/3 товщини епідермісу), KINIII – важка (проявляється проліферацією атипичних кератиноцитів у всіх шарах епідермісу), KINI – інвазивна форма (проникнення атипичних кератиноцитів за межі базальної мембрани). Розподіл біозразків досліджуваних груп у відповідності до рівнів дисплазії епідермісу, розміру пухлини та термінів перебігу захворювання до постановки діагнозу представлені у таблиці 2.

Таблиця 2  
Розподіл біозразків досліджуваних груп у відповідності до рівнів дисплазії епідермісу, розмірів пухлини та термінів перебігу захворювання

Показники	Досліджувані групи біозразків		
	Гр 1	Гр2	Гр3
<b>Всього досліджуваних зразків</b>	<b>20</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
- терміни захворювання (міс)	7,32±3,6	9,9±2,9	11,4±4,8
- діаметр пухлини (см)	0,79±0,41	1,0±0,34	1,3±0,22
<b>Із них, зразків KIN I</b>	<b>6 (30%)</b>	-	-
- терміни захворювання (міс)	4,4±3,1		
- діаметр пухлини (см)	0,63±0,25		
<b>Із них, зразків KIN II</b>	<b>9 (45%)</b>	-	-
- терміни захворювання (міс)	8,1±3,6		
- діаметр пухлини (см)	0,77±0,27		
<b>Із них, зразків KIN III</b>	<b>5 (25%)</b>	<b>10 (100%)</b>	<b>7(70%)</b>
- терміни захворювання (міс)	9,2±1,8	9,9±2,9	10,3±3,3
- діаметр пухлини (см)	0,98±0,3	1,0±0,34	1,2±0,28
<b>Із них, зразків KIN IV</b>	-	-	<b>3 (30%)</b>
- терміни захворювання (міс)			12,4±3,9
- діаметр пухлини (см)			1,4±0,18

При аналізі термінів перебігу захворювання та діаметру пухлини встановлено, що із збільшенням часу перебігу пухлини розмір ураження також збільшується, але статистично достовірних відмінностей між групами виявлено не було (p>0,05).

*Гістологічний метод дослідження.* Отримані тканини фіксували в 10% розчині нейтрального забуференого формаліну на протязі однієї доби, що дозволяло зберегти антигенні детермінанти подальшого для імуногістохімічного дослідження. Після фіксації матеріал зневоднювали проведенням крізь батарею розчинів етилового спирту з підвищенням концентрації: 70% - 80% - 90% - 96% - 100%-1 - 100%-2. Після зневоднення зразки витримували у суміші 100%-вий спирт + хлороформ (1:1), у 3 змінах чистого хлороформу, після цього занурювали у 2 змінах суміші хлороформу + парафіну (у співвідношенні 1:1). Першу зміну витримували при температурі 37 °С, другу - при температурі 56 °С по 0,5 год. У кінці зразки заливалися

парафіном та витримувалися по 1 год при температурі 56 °С. Потім форми із зразками в парафіні поступово охолоджували при кімнатній температурі протягом 5 хв., при +4 °С - 10 хв., при -20 °С - 10 хв. Поступове охолодження блоків дозволяло уникнути утворення тріщин у парафіні.

Парафінові зрізи товщиною 5-6 мкм, отримані на мікротомі Microm HM-340 зі станцією прийому зрізів з температурою води +37 °С, де вони розправлялися. Також використання станції корисне для виготовлення серійних зрізів, що дозволяє порівнювати подібні ділянки при забарвленні гематоксиліном-еозином та різноманітними імуногістохімічними маркерами. Потім зрізи переносили на адгезоване предметне скло та залишали у термостаті при 37 °С протягом 5- 10 хвилин.

Після депарафінізації у ксилолі та регідратації у батареї розчину етанолу (100%-1, 100%-2, 96%, 90%, 80%, 70%), зрізи промивалися дистильованою водою та забарвлювалися за до-

помогою гематоксиліну Майєра 5 хв. (забарвлення ядер) з наступним промиванням у проточній воді з метою диференціювання тканин та розчином еозину протягом 1 хв. (забарвлення цитоплазми) згідно зі стандартним протоколом. Забарвлені зрізи знову дегідрували за вищевказаною схемою та заключали у бальзам або полістирол та накривали покривним склом.

Світлова мікроскопія проводилася за допомогою світлового мікроскопу Zeiss Primo Star з використанням об'єктивів  $\times 10$ ,  $\times 20$ ,  $\times 40$ .

*Імуногістохімічний метод дослідження.* 3 парафінових блоків, виготовлених за вищевказаною методикою, були зроблені зрізи товщиною 4-6 мкм, які були нанесені на спеціально оброблені адгезивні скельця SuperFrost Plus, депарафіновані відповідно до стандарту. У зв'язку з порушенням антигенних детермінант при фіксації у формаліні проведено теплова індукція епітопного звороту, що допомагало відновити їх структуру та збільшити імуногенність до первинних антитіл. Далі використовували нагрівання в цитратному буфері з слабо кислою реакцією рН=6 в автоклаві (7 хвилин при температурі  $+120^{\circ}\text{C}$ ).

Для кожного маркеру проводилися контрольні дослідження, які дозволяли виключити помилково позитивні і помилково негативні результати.

Зрізи інкубували з первинними антитілами у вологих камерах при температурі  $23-26^{\circ}\text{C}$  на протяжці 30 хвилин. Титр первинних антитіл був підібраний для кожного маркеру (табл. 3). У якості розчинника використаний спеціальний розчин antibody diluent (Thermo Scientific, США). Подальший етап проводився за технологією Thermo Scientific, використовуючи систему візуалізації UltraVision Quanto (Thermo Scientific, США). Вторинні антитіла з приєднаними молекулами пероксидази хрому, наносили на зрізи та інкубували у вологих камерах протягом 30 хвилин з наступним промиванням у ТРИС-буферному розчині протягом 10 хвилин.

Таблиця 3  
Первинні моноклональні антитіла

Первинні антитіла	Клон (розведення)	Виробник
p53	Ab-1 (1:200)	Thermo Scientific
Bcl2	Ab-3 (1:100)	Thermo Scientific
Pcna	Ab-1 (1:200)	Thermo Scientific
Vegf	Ab-3 (1:200)	Thermo Scientific
p27	DBS (1:100)	Diagnostic Byosystem

*Морфометричний метод.* Для морфометричного методу використовувалась камера мікроскопу ZeissPrimoStar - AxioCamERC 5s з ліцензованим програмним забезпеченням ZEN 2 blueedition, де інформативні поля зору були зафіксовані в форматі .jpg і далі оброблені в програмі ImageJ. Автоматичний розрахунок індексів експресії інтрануклеарних реакціймаркерів p53, Bcl2, Pcna, p27 здійснювався за допомогою плагіну ImmunoRatio[46]. Плагін дозволяє одночасно аналізувати декілька мікрофотографій одного препарату і в результаті було розраховано середнє значення індексів для інтрануклеарних реакцій в 3-х полях зору (рис. 6).

Інтенсивність експресії маркеру Vegf із цитоплазматичним забарвленням оцінювалось за стандартною шкалою яскравості вбудованої гістограми ImageJ (де 255 – біле, 0 – чорне) після розшарування мікрофотографії на коричневий (хромоген DAB) та блакитний (гематоксилін Майєра) забарвлення плагіном ColourDeconvolution (рис. 7).

*Статистичну обробку матеріалу* проводили з використанням програмного забезпечення MicrosoftOfficeExcel для розрахунку середніх рівнів показника ( $M \pm m$ ) із стандартизованим відхиленням, аналізу отриманих середніх за критерієм Ст'юдента, визначення лінії тренду зміни та кореляційних зв'язків досліджуваних параметрів.

#### Результати та їх обговорення

Результати нашого дослідження було згруповано в залежності від гістологічної патології на ступеня дисплазії епідермісу. Таким чином, ми отримали показники ІГХ маркерів у вогнищі АК, «полі канцеризації», яке було представлено АК, навколо вогнищ SCC і у вогнищі саме SCC в залежності від KIN.

При порівнянні середніх рівнів експресії ІГХ маркерів у вогнищі АК і «полі канцеризації» навколо вогнища SCC, представлено також АК, з'ясувалось, що достовірна різниця мала місце тільки по рівню pcna. Так, у вогнищі АК I-III ступеня дисплазії рівень експресії pcna склав  $35,62 \pm 13,94\%$ , а у вогнищі АК як «поля канцеризації» -  $44,91 \pm 12,72\%$  ( $p=0,014$ ), що свідчить про більш активні процеси проліферації клітин. Рівень експресії pcna у вогнищі АК I-III ступеня дисплазії був достовірно нижчим в порівнянні із рівнем експресії цього маркера у вогнищі SCC ( $48,11 \pm 12,13\%$ ,  $p=0,011$ ), що підтверджує активність проліферації у вогнищі раку шкіри [23]. При цьому у біозразках SCC рівень експресії pcna вищий і склав  $51,2 \pm 13,4\%$  (табл. 4).

Рівні експресії bcl-2 у вогнищі АК, «полі канцеризації» і SCC ( $13,01 \pm 7,06\%$ ,  $17,53 \pm 9,45\%$  і  $15,32 \pm 5,92\%$  відповідно) не мали достовірної різниці ( $p=0,114$  і  $p=0,05$ ), що може свідчити про



відносно низьку активність антиапоптозного білка bcl-2 у нашому дослідженні [38]. При цьому у біозразках АК I KIN рівень експресії bcl-2 нижчий і склав  $10 \pm 6,4\%$ , а у біозразках SCC іс вищий -  $18,1 \pm 6,5\%$  (табл. 4).

Рівні експресії p27 у вогнищі АК, «полі канцеризації» і SCC ( $20,25 \pm 8,41\%$ ,  $26,31 \pm 12,69\%$  і  $26,52 \pm 9,84\%$  відповідно) не мали достовірної

різниці ( $p=0,093$  і  $p=0,092$ ), що може свідчити про можливість прогресування неоплазії від доброякісної пухлини до *in situ* і інвазивного раку при втраті рівня p27 в ядрі [6,7]. При цьому рівні експресії p27 у «полі канцеризації» при SCC і вогнищі SCC вищі –  $31,8 \pm 14\%$  і  $29,5 \pm 11\%$  відповідно (табл. 4).

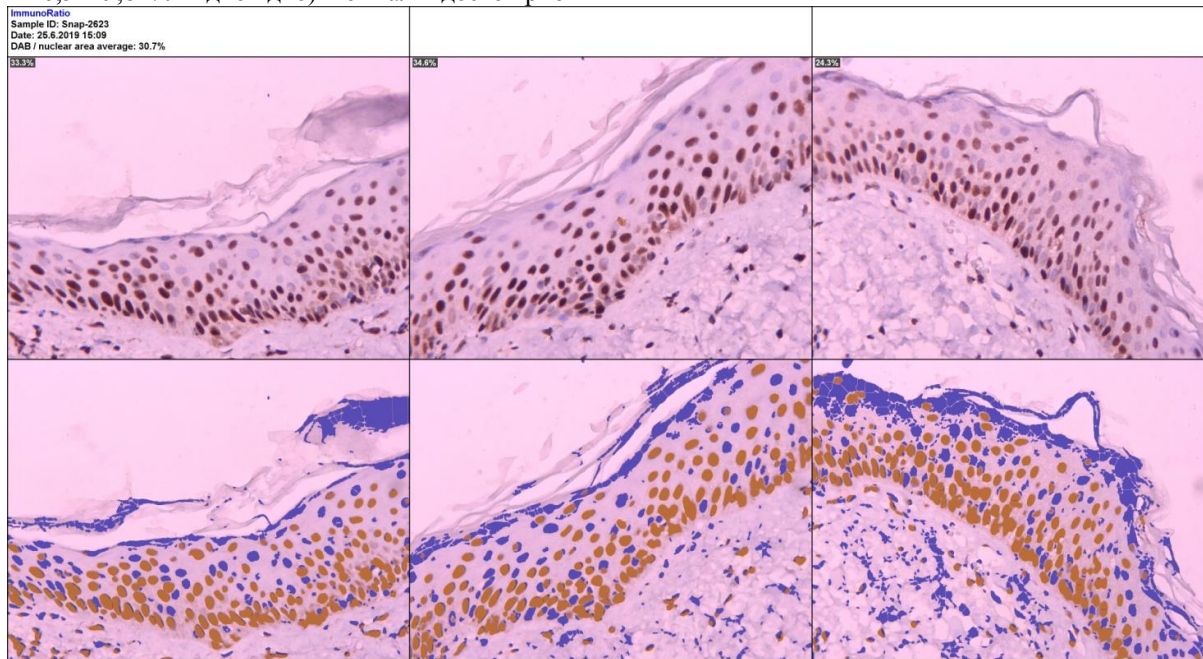


Рис. 6. Середнє значення інтрануклеарної позитивної реакції(%) розраховане плагіном ImmunoRatios програмі обробки цифрових зображень ImageJ.

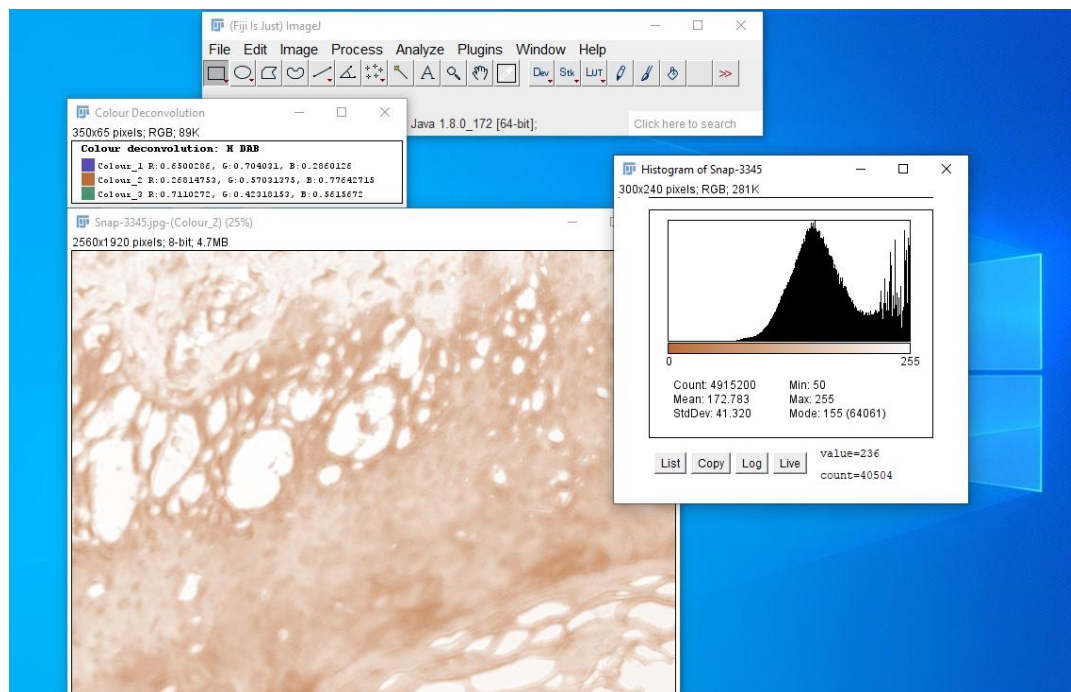


Рис. 7. Відокремлення плагіном Colour Deconvolution забарвлення хромогену DAB ІГХ реакції з маркером Vegf; визначення середнього значення інтенсивності яскравості та стандартного відхилення вбудованою гістограмою програмі обробки цифрових зображень ImageJ.

Рівні експресії p53 у вогнищі АК, «полі канцеризації» і SCC (15,3±10,31%, 15,7±16,35% і 16,26±16,67% відповідно) не мали достовірної різниці ( $p=0,894$  і  $p=0,967$ ) при вищих рівнях експресії маркера у «полі канцеризації» у вогнищі cSCC IV KIN і у вогнищі cSCC III KIN – 27,3±0,75% і 21,5±11,08% відповідно (таб.4). Такі результати дослідження, дозволяють нам зробити припущення, що у вогнищі АК зберігається регуляторний вплив на клітинний цикл p53 сигнального шляху [16,17]. Підвищення експресії p53 призводить до зупинки клітинного циклу у фазі G1 і індукції відновлення ДНК, що дозволяє клітинам знову входити в мітогичний цикл, а при невдалому відновленні ДНК - p53 ініціює апоптоз [16].

Рівні експресії vegf у вогнищі АК, «полі канцеризації» і SCC також не мали достовірних відмінностей ( $p=0,952$ ,  $p=0,899$ ) і мали високі рівні, а саме 172,4±18,8, 172,83±22,07 і

168,97±20,34 відповідно (таб.4). При цьому найвищі рівні експресії ми спостерігали у «полі канцеризації» навколо вогнища cSCC IV KIN (181,9±21,7) і у самому вогнищі cSCC IV KIN (190±12,3).

Оцінюючи лінії тренду зміни рівнів маркерів у вогнищі АК, необхідно відмітити, що із збільшенням рівня дисплазії епідермісу (від II-III при АК до III-IV при SCC) має місце підвищення рівня bcl-2 ( $R^2=0.815$ ), p53 ( $R^2=0.744$ ) vegf mean ( $R^2=0.680$ ), що свідчить про створення тканинних умов для злоякісного прогресування пухлини і зростання активності ангиогенезу в зоні ураження (рис.8). Хоча рівні маркерів pscn ( $R^2=0,390$ ) і p27 ( $R^2=0,093$ ) мали підвищення у вогнищі АК при неінвазивній формі плоскоклітинного раку, але загальна тенденція достовірно не відрізнялась при різних рівнях дисплазії (рис. 8).

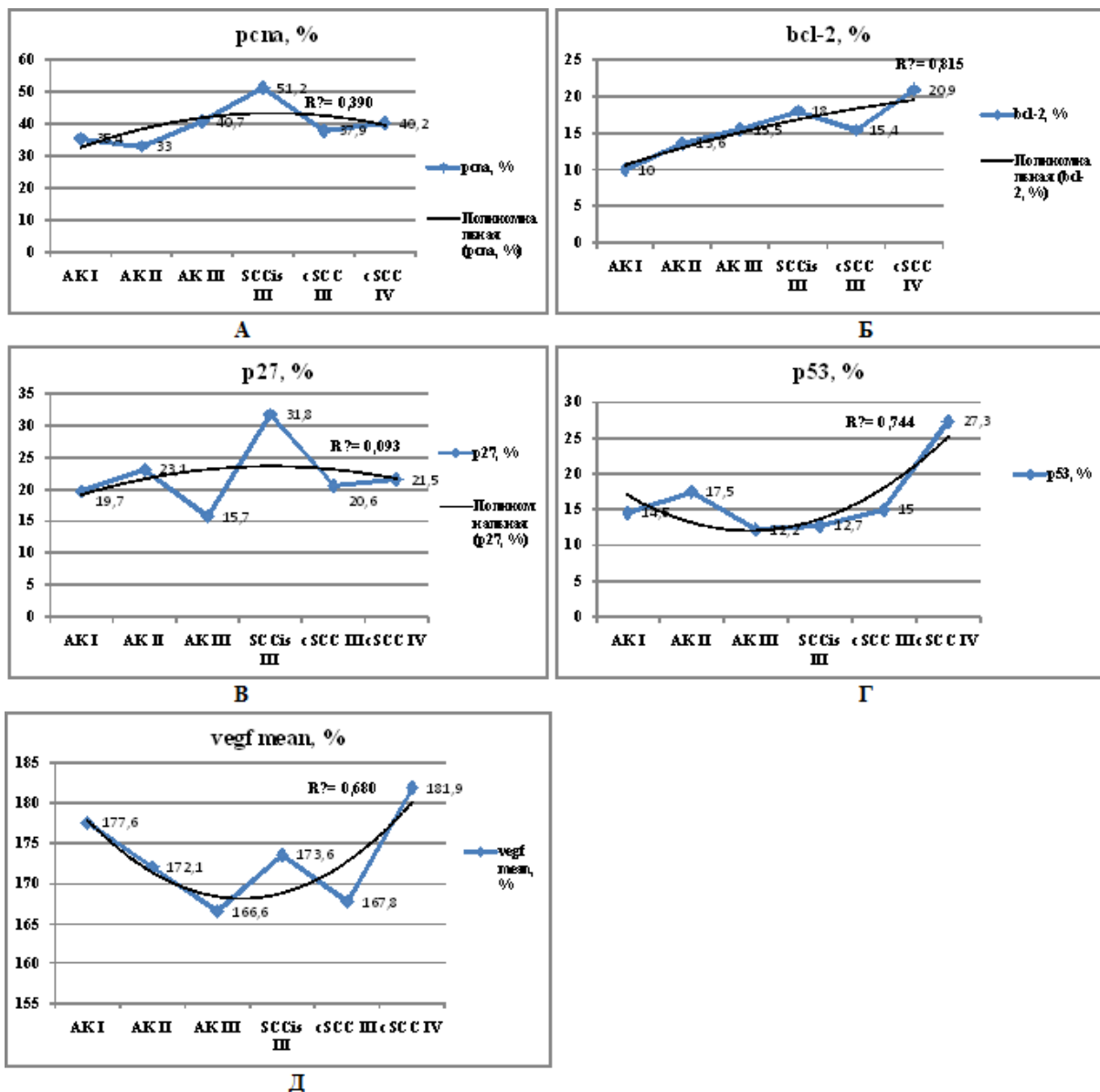


Рис.8. Результати ПХ досліджень у вогнищах актинічного кератозу (в біоптатах АК, SCCis, cSCC) відповідно до рівня дисплазії епідермісу (KIN): А – рівні pscn (%), Б - bcl-2 (%), В - p27 (%), Г- p53 (%), Д - vegf mean (%).

Така тенденція може спостерігатися при високій проліферативній активності клітин пухлини, як у зоні преканцерозу та і у зоні раку, при зниженні контролюючої функції p27 за клітинним циклом.

Оцінюючи лінії тренду зміни рівнів

маркерів у вогнищі плоскоклітинного раку шкіри, необхідно відмітити, що із збільшенням рівня дисплазії епідермісу має місце підвищення рівня pсna( $R^2=1,0$ ) і vegf mean ( $R^2=1,0$ ), при зниженні рівнів bcl-2 ( $R^2=1,0$ ), p53 ( $1,0$ ) і p27 ( $R^2=1,0$ ) (рис. 9).

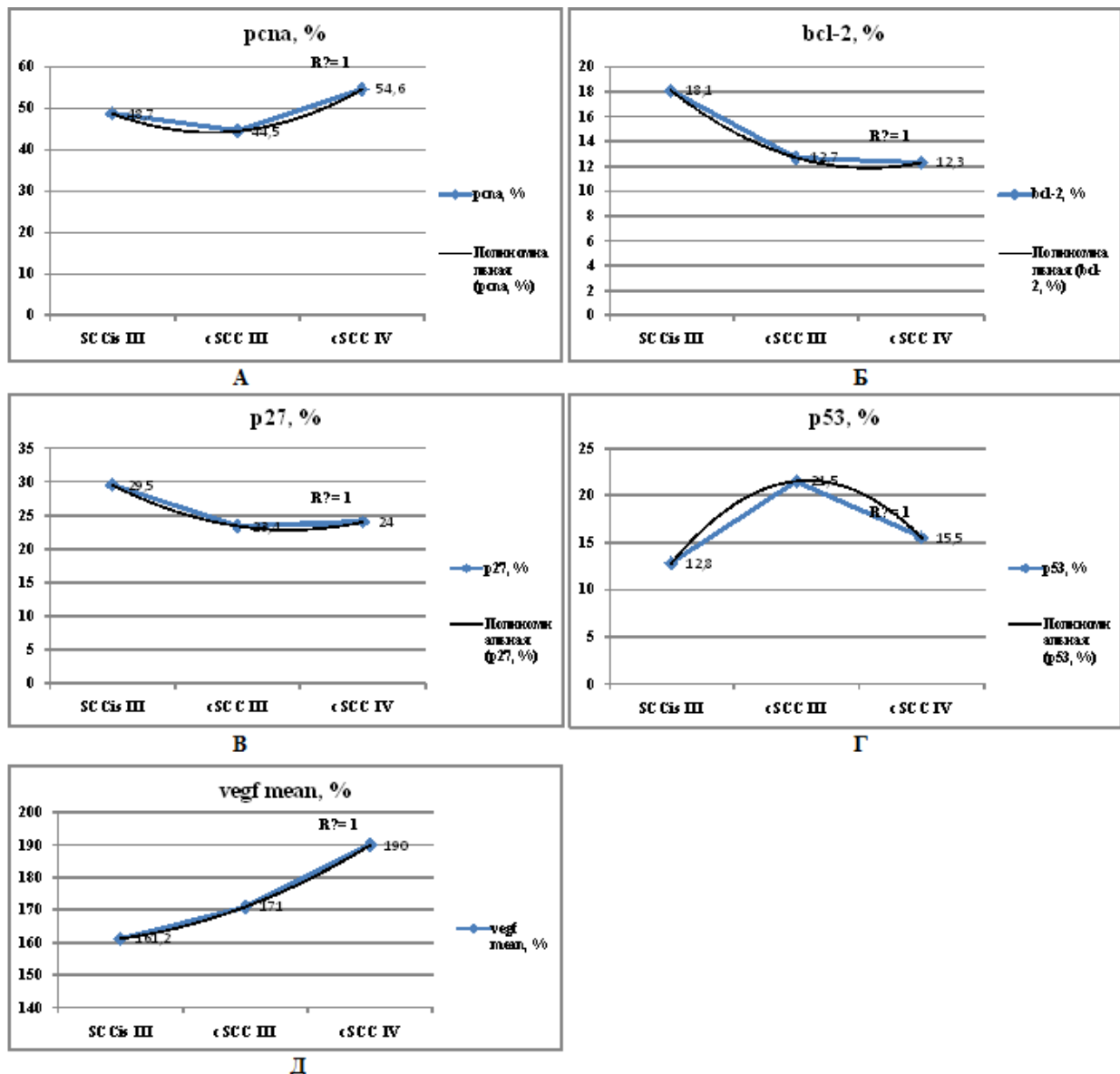


Рис.9. Результати ІГХ досліджень у вогнищах плоскоклітинного раку шкіри (в біоптатах SCCis і cSCC) відповідно до рівня дисплазії епідермісу (KIN): А – рівні pсna (%), Б - bcl-2 (%), В - p27 (%), Г- p53 (%), Д - vegf mean (%).

Тенденції у збільшенні рівнів pсna і vegf mean, як маркерів проліферації та активності неоангіогенезу, на фоні зниження рівня bcl-2, p53 і p27, як маркерів апоптотичної гибелі клітини,

можна розцінювати з позиції втрати контролюючої функції білків p53 і p27 за розмноженням генетично детермінованих клітин, і, як наслідок, прогресії неоплазії.

У нашому дослідженні у вогнищі АК спостерігається середньої сили прямий кореляційний зв'язок між маркерами pсna і p27 ( $r=0,620$ ), а також прямий помірний зв'язок між маркерами p27 і bcl-2 ( $r=0,337$ ) та p53 і vegfmean ( $r=0,395$ ). Це свідчить про компенсаторне збільшення активності p27 і bcl-2 у вогнищі АК при підвищенні рівня проліферації клітин. Між маркерами pсna і p53 ( $r=0,219$ ), bcl-2 і vegfmean ( $r=0,218$ ), p27 і p53 та vegfmean ( $r=0,16$  і  $r=0,076$  відповідно) ми спостерігали зворотній зв'язок слабкої сили (рис. 10).

Аналізуючи кореляційні зв'язки у вогнищі плоскоклітинного раку спостерігається прямий зв'язок помірної сили між маркерами pсna і p27 ( $r=0,326$ ), p53 ( $r=0,457$ ), vegfmean ( $r=0,469$ ). Це свідчить про збільшення активності процесів неопластичної прогресії. Між маркером bcl-2 та маркерами pсna ( $r=0,122$ ), p27 ( $r=0,072$ ), p53 ( $r=0,1$ ), і vegfmean ( $r=0,258$ ) ми виявили слабкий зворотній зв'язок. А між маркерами p27 та p53 ( $r=0,492$ ) спостерігався прямий зв'язок помірної сили і між p27 та vegfmean ( $r=0,037$ ) - слабкий зворотній зв'язок (рис. 11).

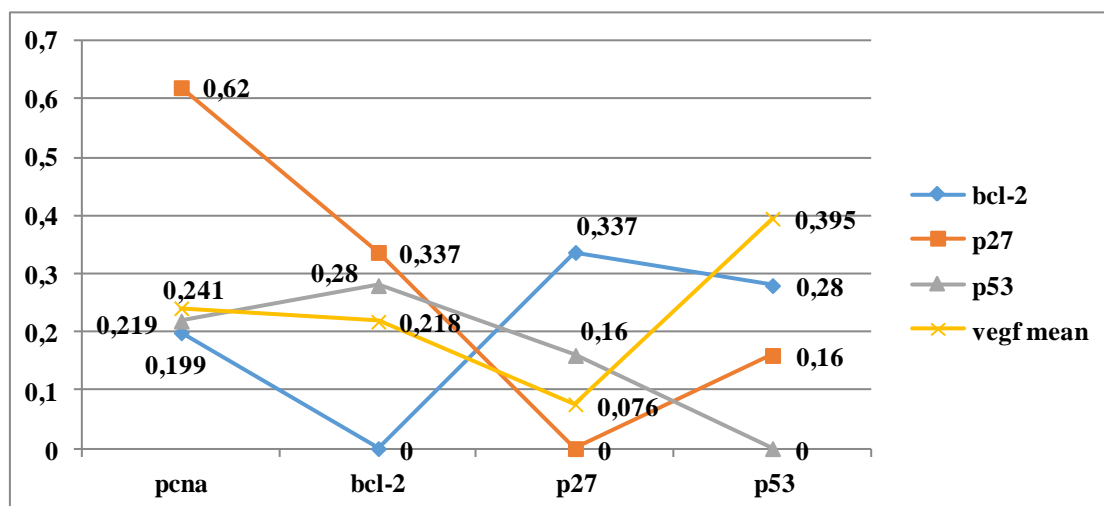


Рис. 10. Кореляційні зв'язки між досліджуваними маркерами у вогнищі актинічного кератозу.

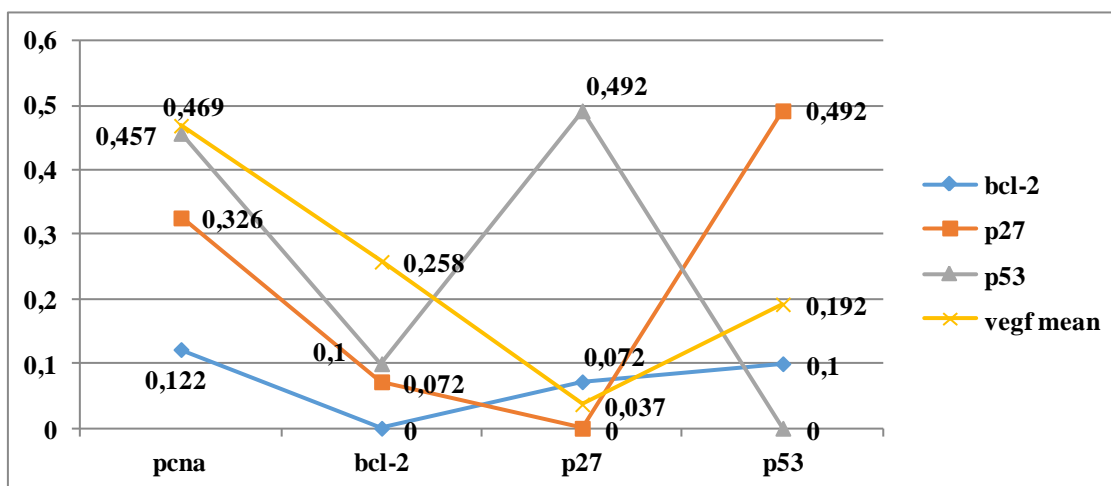


Рис. 11. Кореляційні зв'язки між досліджуваними маркерами у вогнищі актинічного кератозу.

### Висновки

Проведене нами дослідження імуногістохімічних особливостей у вогнищі АК, «полі канцеризації», представленого зонами АК навколо зон плоскоклітинного раку, і саме вогнищі плоскоклітинного раку дозволило розширити наукові знання про шляхи впливу на клітинний цикл при епідермальних дисплазіях шкіри:

1. При порівнянні середніх рівнів експресії досліджуваних ІГХ маркерів у вогнищі АК, «полі канцеризації» і у вогнищі SCC, з'ясувалось, що достовірна різниця мала місце тільки по рівню експресії pсna, який був достовірно вищим у «полі канцеризації» ( $p=0,014$ ) і у вогнищі плоскоклітинного раку шкіри ( $p=0,011$ ), що свідчить про вищу активність проліферації у цих зонах ураження.



2. Відсутність достовірної різниці ( $p=0,05$ ) між рівнями маркерів bcl-2, p27, p53 і vegf у вогнищі АК, «полі канцеризації» і у вогнищі SCC підтверджує наукову думку про близькість молекулярно-генетичних змін між актинічним кератозом і плоскоклітинним раком шкіри.

3. Із збільшенням рівня дисплазії епідермісу (від II-III при АК до III-IV при SCC) має місце тенденція підвищення рівня bcl-2 ( $R^2=0.815$ ), p53 ( $R^2=0.744$ ) vegf mean ( $R^2=0.680$ ) у зоні АК і «полі канцеризації», що свідчить про створення тканинних умов для злоякісного прогресування пухлини і зростання активності ангиогенезу в зоні ураження.

4. Тенденції у збільшенні рівнів p53 і vegf на фоні зниження рівня bcl-2, p27 у зоні SCC ( $R^2=1,0$ ) може свідчити про втрату контролюючої функції білків p53, p27 за розмноженням генетично детермінованих клітин, і, як наслідок, прогресії пухлинного росту.

5. У вогнищі АК спостерігається середньої сили прямий кореляційний зв'язок між маркерами p53 і p27 ( $r=0,620$ ), а також прямий помірний зв'язок між маркерами p27 і bcl-2 ( $r=0.337$ ) та p53 і vegfmean ( $r=0.395$ ), що свідчить про компенсаторне збільшення активності p27 і bcl-2 у вогнищі АК при підвищенні рівня проліферації клітин.

6. У вогнищі SCC спостерігається прямий

зв'язок помірної сили між маркерами p53 і p27 ( $r=0,326$ ), p53 ( $r=0.457$ ), vegfmean ( $r=0.469$ ). що свідчить про збільшення активності процесів неопластичної прогресії.

#### **Перспективи подальших розробок**

Подальші дослідження молекулярно-генетичних та імуногістохімічних змін у вогнищі актинічного кератозу і плоскоклітинного раку шкіри дозволять виділити диференційні детермінанти епідермальних дисплазій шкіри, прослідкувати активність шляхів апоптозу і канцерогенезу при даній патології шкіри.

#### **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-дослідних тем «Розробка моделі організації багатофакторної профілактики та управління якістю медичної допомоги при окремих хронічних інфекційних захворюваннях прикріпленого населення» (номер державної реєстрації 0114U00211) і «Морфологічні та молекулярно-генетичні критерії діагностики та прогнозу перебігу передпухлинних станів та новоутворень різних локалізацій» (номер державної реєстрації 0119U100027).

### **Літературні джерела References**

1. Abbastabar M, Kheyrollah M, Azizian K, Bagherlou N, Tehrani SS, Maniati M, Karimian A. Multiple functions of p27 in cell cycle, apoptosis, epigenetic modification and transcriptional regulation for the control of cell growth: A double-edged sword protein. *DNA Repair (Amst)*. 2018;69:63-72.

2. Dai L, Liu Y, Liu J, Wen X, Xu Z, Wang Z, Sun H, Tang S, Maguire AR, Quan J, Zhang H, Ye T. A novel cyclinE/cyclinA-CDK inhibitor targets p27(Kip1) degradation, cell cycle progression and cell survival: implications in cancer therapy. *Cancer Lett*. 2013;333(1):103-112.

3. Ra SH, Li X, Binder S. Molecular discrimination of cutaneous squamous cell carcinoma from actinic keratosis and normal skin. *Modern Pathology*. 2011;24:963-973.

4. Wander SA, Zhao D, Slingerland JM. p27: A Barometer of Signaling Deregulation and Potential Predictor of Response to Targeted Therapies. *Clin Cancer Res*. 2011;17(1):12-18.

5. Chu IM, Hengst L, Slingerland JM. The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2008;8:253-267.

6. Catzavelos C, Bhattacharya N, Ung YC. Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27Kip1

protein: prognostic implications in primary breast cancer. *Nat Med*. 1997;3:227-230.

7. Han S, Park K, Kim HY, Lee MS, Kim HJ, Kim YD. Reduced expression of p27Kip1 protein is associated with poor clinical outcome of breast cancer patients treated with systemic chemotherapy and is linked to cell proliferation and differentiation. *Breast Cancer Res Treat*. 1999;55:161-167.

8. Sui L, Dong Y, Ohno M. Implication of malignancy and prognosis of p27(kip1), Cyclin E, and Cdk2 expression in epithelial ovarian tumors. *Gynecol Oncol*. 2001;83:56-63.

9. Korkolopoulou P, Vassilopoulos I, Konstantinidou AE. The combined evaluation of p27Kip1 and Ki-67 expression provides independent information on overall survival of ovarian carcinoma patients. *Gynecol Oncol*. 2002;85:404-414.

10. Haider AS, Peters SB, Kaporis H. Genomic analysis defines a cancer-specific gene expression signature for human squamous cell carcinoma and distinguishes malignant hyperproliferation from benign hyperplasia. *J Invest Dermatol*. 2006;126:869-881.

11. Legg JA, Herbert JM, Clissold P. Slits and roundabouts in cancer, tumour angiogenesis and endothelial cell migration. *Angiogenesis*.

2008;11:13–21.

12. Liu Z, Yang X, Tan F. Molecular cloning and characterization of human Castor, a novel human gene upregulated during cell differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;344:834–844.

13. Jin T, Fantus GI, Sun J. Wnt and beyond Wnt: multiple mechanisms control the transcriptional property of beta-catenin. *Cell Signal.* 2008;20:1697–1704.

14. Paul S, Dey A. Wnt signaling and cancer development: therapeutic implication. *Neoplasma.* 2008;55:165–176.

15. Brash DE, Ziegler A, Jonason AS. Sunlight and sunburn in human skin cancer: p53, apoptosis, and tumor promotion. *J Invest Dermatol Symp Proc.* 1996;1:136–142.

16. Li T, Kon N, Jiang L, Tan M, Ludwig T, Zhao Y, Baer R, Gu W. Tumor Suppression in the Absence of p53-Mediated Cell-Cycle Arrest, Apoptosis, and Senescence. *Cell.* 2012;149(6):1269–1283.

17. Benjamin CL, Melnikova VO, Ananthaswamy HN. P53 protein and pathogenesis of melanoma and nonmelanoma skin cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2008;624:265–282.

18. Bachs O, Gallastegui E, Orlando S, Bigas A, Morante-Redolat JM, Serratos J, Fariñas I, Aligüé R, Pujol MJ. Role of p27<sup>Kip1</sup> as a transcriptional regulator. *Oncotarget.* 2018;9(40):26259–26278.

19. Bologna-Molina R, Mosqueda-Taylor A, Molina-Frecherro N, Mori-Estevez AD, Sánchez-Acuña G. Comparison of the value of PCNA and Ki-67 as markers of cell proliferation in ameloblastic tumor. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2013;18(2):e174–e179.

20. Kelman Z. PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene.* 1997;14:629–40.

21. de Oliveira MG, Lauxen-Ida S, Chaves AC, Rados PV, Sant'AnaFilho M. Immunohistochemical analysis of the patterns of p53 and PCNA expression in odontogenic cystic lesions. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2008;13:E275–280.

22. Mighell A. PCNA and p53. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 1995;31B:403–404.

23. Juríková M, Danihel Ľ, Polák Š, Varga I. Ki67, PCNA, and MCM proteins: Markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer. *Acta Histochem.* 2016;118:544–552.

24. Qiu X, Mei J, Yin J, Wang H, Wang J. Correlation analysis between expression of PCNA, Ki-67 and COX-2 and X-ray features in mammography in breast cancer. *Oncology Letters.* 2017;14(3):2912–2918.

25. Bouchbika Z, Benchakroun N, Taleb A, Jouhadi H, Tawfiq N, Sahraoui S, Benider A. Association between overexpression of Her-2 and other clinicopathologic prognostic factors in breast cancer in Morocco. *J Cancer Ther.* 2012;3:787–792.

26. Qu DW, Liu Y, Wang L, Xiong Y, Zhang CL, Gao DS. Glial cell line-derived neurotrophic factor promotes proliferation of neuroglioma cells

by up-regulation of cyclins PCNA and Ki-67. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2015;19:2070–2075.

27. Maga G, Hübscher U. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *Journal of Cell Science.* 2003;116:3051–3060.

28. Ferrara N. Vascular Endothelial Growth Factor as a target for anticancer therapy. *Oncologist.* 2004;9:2–10.

29. Rak J, Yu JL, Klement G. Oncogenes and angiogenesis: signaling three-dimensional tumor growth. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* 2000;5(1):24–33.

30. Miletic H. Anti-VEGF therapies for malignant glioma: treatment effects and escape mechanisms. *Expert Opin.* 2009;13(4):455–468.

31. Guo D, Murdoch C, Liu T, Qu J. Therapeutic Angiogenesis of Chinese Herbal Medicines in Ischemic Heart Disease: A Review. *Frontiers in Pharmacology.* 2018;9:428.

32. Poon RT, Fan ST, Wong J. Clinical implications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *J. Clin. Oncol.* 2001;19(4):1207–1225.

33. Abramsson A, Berlin O, Papayan H. Analysis of mural cell recruitment to tumor vessels. *Circulation.* 2002;105(1):112–117.

34. Benjamin LE, Keshet E. Conditional switching of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in tumors: induction of endothelial cell shedding and regression of hemangioblastoma – like vessels by VEGF withdrawal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997;94(16):8761–8766.

35. Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 1998;273(21):13313–13316.

36. Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J. Biol. Chem.* 1998;273(46):30336–30343.

37. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2008;9:47–59.

38. Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin NM, Newmeyer DD, Schuler M, Green DR. Direct Activation of Bax by p53 Mediates Mitochondrial Membrane Permeabilization and Apoptosis. *Science.* 2004;303(5660):1010–1014.

39. Kang MH, Reynolds CP. Bcl-2 Inhibitors: Targeting Mitochondrial Apoptotic Pathways in Cancer Therapy. *Clinical Cancer Research.* 2009;15:1126–32.

40. Yip KW, Reed JC. Bcl-2 family proteins and cancer. *Nature Oncogene.* 2008;27:6398–6406.

41. Tsujimoto Y. Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? *Genes*

Cells. 1998;3:697-707.

42. Ludwig LM, Nassin ML, Hadji A, LaBelle JL. Killing Two Cells with One Stone: Pharmacologic BCL-2 Family Targeting for Cancer Cell Death and Immune Modulation. *Frontiers in Pediatrics*. 2016;4:135.

43. Chen A, Madu CO, Lu Y. The Functional Role of Bcl-2 Family of Proteins in the Immune System and Cancer. *Oncomedicine*. 2019;4:17-26.

44. Hameetman L, Commandeur S, Bouwes Bavinck JN, Wisgerhof HC, de Gruijl FR., Willemze R, Mullenders L, Tensen CP, Vrieling H. Molecular

profiling of cutaneous squamous cell carcinomas and actinic keratoses from organ transplant recipients. *BMC Cancer*. 2013;13:58.

45. Padilla RS, Sebastian S, Jiang Z, Nindl Larson R. Gene Expression Patterns of Normal Human Skin, Actinic Keratosis, and Squamous Cell Carcinoma. *Arch dermatol*. 2010;146(3):288-293.

46. Poslavska OV. [Methodology for the use of software for the analysis of digital micrographs on the base of pathomorphology course in order to increase the professional level of students and scientists]. *Morphologia*. 2015;9(3):122-6. Ukrainian

**Ошивалова О.О., Калюжна Л.Д., Шпонька І.С., Пославська О.В. Імуногістохімічні особливості вогнищ актинічного кератозу.**

**РЕФЕРАТ. Актуальність.** Пошкодження шкіри по типу актинічного кератозу (АК- actinickeratosis) та плоскоклітинного раку in situ (SCCis - squamous cell carcinoma in situ) вважаються попередниками cSCC. Поширена теорія про ступеневий перехід від нормальної шкіри до АК та cSCC. Деякі вчені вважають, що АК таке ж ракове ураження, як cSCC. **Мета.** Дослідити комплекс імуногістохімічних характеристик спостережень ділянок АК, SCCis і cSCC з метою подальшого вдосконалення профілактичних заходів. **Методи.** Було використано біозразки 20 (50%) пацієнтів з АК, 10 (25%) – SCCis, 10 (25%) - cSCC. Визначено рівні дисплазії епідермісу (KIN). Світлова мікроскопія проводилася світловим мікроскопом Zeiss Primo Star з використанням об'єктивів  $\times 10$ ,  $\times 20$ ,  $\times 40$ , для морфо метричного дослідження використовувалась камера мікроскопу ZeissPrimoStar - АхіосамERC 5s з ліцензованим програмним забезпеченням ZEN 2 blue edition. Статистичну обробку матеріалу проводили з використанням програмного забезпечення Microsoft Office Exel. **Результати.** При порівнянні рівнів експресії досліджуваних маркерів у вогнищі АК, «полі канцеризації» і SCC достовірна різниця мала місце тільки по рівню експресії рсna ( $p=0,014$  і  $p=0,011$ ). Із збільшенням рівня дисплазії епідермісу має місце тенденція підвищення рівня bcl-2 ( $R^2=0.815$ ), p53 ( $R^2=0.744$ ) vegf mean ( $R^2=0.680$ ). Тенденції у збільшенні рівнів рсna і vegf на фоні зниження рівня bcl-2, p53 і p27 у зоні SCC ( $R^2=1,0$ ). **Висновки.** Дослідження підтверджує наукову думку про близькість імуногістохімічних змін у вогнищі АК і cSCC.

**Ключові слова:** актинічний кератоз, плоско клітинний рак шкіри, клітинний цикл, шляхи апоптозу, канцерогенез.

**Ошивалова Е. А., Калюжная Л.Д., Шпонька И. С., Пославская А. В. Иммуногистохимические особенности очагов актинического кератоза.**

**РЕФЕРАТ. Актуальность.** Повреждение кожи по типу актинического кератоза (АК actinic keratosis) и плоскоклеточного рака in situ (SCCis - squamous cell carcinoma in situ) считаются предшественниками cSCC. Распространена теория о ступенчатом переходе от нормальной кожи к АК и cSCC. Некоторые ученые считают, что АК такое же раковое поражение, как cSCC. **Цель.** Исследовать комплекс иммуногистохимических характеристик наблюдений участков АК, SCCis и cSCC с целью дальнейшего совершенствования профилактических мероприятий. **Методы.** Было использовано биообразцы 20 (50%) пациентов с АК, 10 (25%) - SCCis, 10 (25%) - cSCC. Определены уровни дисплазии эпидермиса (KIN). Световая микроскопия проводилась световым микроскопом Zeiss Primo Star с использованием объективов  $\times 10 \times 20 \times 40$ , для морфометрического исследования использовалась камера микроскопа Zeiss Primo Star - Ахіосам ERC 5s с лицензированным программным обеспечением ZEN 2 blue edition. Статистическую обработку материала проводили с использованием программного обеспечения Microsoft Office Exel. **Результаты.** При сравнении уровней экспрессии исследуемых маркеров в очаге АК, «поле канцеризации» и SCC достоверная разница имела место только по уровню экспрессии рсna ( $p = 0,014$  и  $p = 0,011$ ). С увеличением уровня дисплазии эпидермиса имеет место тенденция повышения уровня bcl-2 ( $R2 = 0.815$ ), p53 ( $R2 = 0.744$ ) vegf mean ( $R2 = 0.680$ ). Тенденции в увеличении уровней рсna и vegf на фоне снижения уровня bcl-2, p53 и p27 в зоне SCC ( $R2 = 1,0$ ). **Выводы.** Исследование подтверждает научные данные о близости иммуногистохимических изменений в очаге АК и cSCC.

**Ключевые слова:** актинический кератоз, плоскоклеточный рак кожи, клеточный цикл, пути апоптоза, канцерогенез.