

ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»

УДК 577.346'31:618.14-006.66-085.849.114(043.3)

ЗИНОВКИН
Дмитрий Александрович

**ВЛИЯНИЕ ГАММА-ИЗЛУЧЕНИЯ
НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНУЮ ХАРАКТЕРИСТИКУ
ОПУХОЛЕВОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ ЭНДОМЕТРИОИДНОЙ
АДЕНОКАРЦИНОМЫ ТЕЛА МАТКИ**

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Минск, 2021

Научная работа выполнена в учреждении образования «Гомельский государственный медицинский университет»

Научный руководитель: **Надыров Эльдар Аркадьевич**, кандидат медицинских наук, доцент, доцент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии учреждения образования «Гомельский государственный медицинский университет»

Официальные оппоненты: **Мельнов Сергей Борисович**, доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры анатомии учреждения образования «Белорусский государственный университет физической культуры»

Стожаров Александр Николаевич, доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры радиационной медицины и экологии учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет»

Оппонирующая организация:

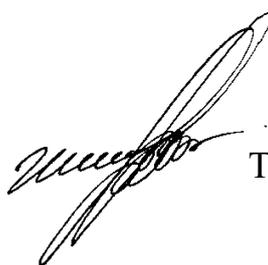
Учреждение образования «Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова» Белорусского государственного университета

Защита состоится 22 декабря 2021 года в 14⁰⁰ на заседании Совета по защите диссертаций Д 01.36.01 при ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси» по адресу: 220072, г. Минск, ул. Академическая, 28; *e-mail:khrustaleva.lir@gmail.com*, тел./факс: 8 (017) 378-16-30.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси».

Автореферат разослан «__» ноября 2021 года.

Ученый секретарь
Совета по защите диссертаций Д 01.36.01
кандидат биологических наук



Т.А. Хрусталёва

ВВЕДЕНИЕ

В лечении злокачественных эпителиальных опухолей широко используются методы лучевой терапии. Концепция радиочувствительности рака, как новообразования, представленного исключительно эпителиальными опухолевыми клетками, является на сегодняшний день спорной [Kissel M. et al., 2020]. Радиочувствительность эпителиальных злокачественных новообразований неоднородна, так паренхима опухоли является достаточно чувствительной к воздействию ионизирующего излучения, в то время как строма за счет экспрессии молекул опухолевой прогрессии и активации сигнальных путей выживания обладает низкой радиочувствительностью [Ansems M. et al., 2020].

Известно, что воздействие на клетки злокачественных новообразований перепрограммирует опухолевое микроокружение. Высвобождение антигенов из разрушающихся опухолевых клеток, происходящее при изменении опухолевого микроокружения, приводит к развитию эффекта противоопухолевой вакцинации *in situ* и подавлению экспрессии молекул опухолевой прогрессии [Golden E. B. et al., 2020].

T-регуляторные лимфоциты играют одну из ключевых ролей в развитии иммунных реакций в опухолевом микроокружении, однако их вклад в биологический ответ злокачественной опухоли на ионизирующее излучение слабо изучен [Salama A. K. et al., 2016]. NK-лимфоциты под действием лучевой терапии с одной стороны увеличивают противоопухолевую активность, в то же время в ряде случаев происходит подавление цитотоксичности данного типа клеток [Mondini M. et al., 2020]. На сегодняшний день представляют научный интерес изменения экспрессии молекул опухолевой прогрессии, регулирующих неядерную рецепцию прогестерона (PGRMC1), а также иммуносупрессию, апоптоз опухолевых клеток и неоангиогенез (Galectin-1) в изменённом ионизирующим излучением опухолевом микроокружении [Chen Y. F. et al., 2021].

Эндометриоидная аденокарцинома тела матки является одним из наиболее часто диагностируемых гинекологических раков в мире. При ее лечении активно используется внутриволостная брахитерапия с применением гамма-излучения [Urick M. E., 2018]. Внутриволостная брахитерапия эндометриоидной аденокарциномы тела матки, за счет отсутствия воздействия на регионарные лимфатические узлы малого таза позволяет использовать этот метод в качестве биологической модели воздействия гамма-излучения. При этом оценка инфильтрации

T-регуляторными, NK-лимфоцитами и экспрессии PGRMC1 и Galectin-1 стромой и паренхимой позволит расширить понимание механизмов лучевого воздействия на ткани эндометриоидной аденокарциномы тела матки [Alban G. M. et al., 2020].

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с крупными научными программами, темами

Тема диссертации соответствует приоритетным направлениям научно-технической деятельности в Республике Беларусь на 2016–2020 годы, утвержденным указом Президента Республики Беларусь от 22.04.2015 № 166 (пункт 4. Медицина, фармация, медицинская техника: технологии профилактики, диагностики и лечения заболеваний) и приоритетным направлениям научных исследований Республики Беларусь на 2016–2020 годы, утвержденным постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 12.03.2015 № 190 (пункт 3. Биологические системы и технологии, пункт 4. Медицина и фармация и пункт 12. Междисциплинарные исследования).

Диссертация выполнена в рамках НИОК(Т)Р: «Разработка и внедрение прогностической модели течения эндометриоидной аденокарциномы тела матки на основании патоморфологических параметров опухолевого микроокружения» (номер государственной регистрации №20190038 от 24.01.2019 года, головное учреждение – УО «Гомельский государственный медицинский университет»). Сроки выполнения: 01.01.2019–31.12.2019 года.

Цель и задачи исследования

Цель исследования – выявить изменения опухолевого микроокружения эндометриоидной аденокарциномы тела матки в ответ на гамма-облучение, а также установить их роль в безрецидивной выживаемости женщин с данным заболеванием.

Задачи исследования:

1. Выявить влияние гамма-облучения на уровень T-регуляторных и NK-лимфоцитов в ткани эндометриоидной аденокарциномы тела матки.

2. Оценить характер экспрессии молекул опухолевой прогрессии в паренхиматозном и стромальном компоненте эндометриоидной аденокарциномы тела матки при воздействии гамма-облучения.

3. На основании пороговых значений исследуемых параметров определить эффект гамма-облучения на безрецидивную выживаемость пациенток с эндометриоидной аденокарциномой тела матки.

Объект исследования: ткани эндометриоидной аденокарциномы тела матки I–III стадии лиц, подвергавшихся и не подвергавшихся предоперационному гамма-облучению.

Предмет исследования: клинические, иммуногистохимические показатели опухолевого микроокружения эндометриоидной аденокарциномы тела матки I–III стадии у женщин, получавших и не получавших предоперационную гамма-лучевую терапию.

Научная новизна

Впервые установлены количественные изменения FoxP3⁺ Т-регуляторных и CD56⁺ НК-лимфоцитов в паренхиме и опухолевом микроокружении эндометриоидной аденокарциномы тела матки как ответ на гамма-лучевую терапию.

Впервые определен эффект гамма-облучения на экспрессию PGRMC1 и Galectin-1 в строме и паренхиме эндометриоидной аденокарциномы тела матки.

Установлены статистически значимые взаимосвязи между количеством FoxP3⁺ Т-регуляторных, CD56⁺ НК-лимфоцитов, характером экспрессии PGRMC1, Galectin-1 и клиническим течением заболевания после воздействия гамма-облучения.

На основании проведенного исследования определены пороговые значения анализируемых показателей, что позволило оценить влияние изучаемых параметров на безрецидивную выживаемость пациенток, страдающих эндометриоидной аденокарциномой тела матки, после воздействия гамма-облучения.

Положения, выносимые на защиту

1. При воздействии гамма-облучения происходит изменение комплекса параметров опухолевого микроокружения эндометриоидной аденокарциномы тела матки, характеризуемое увеличением количества паренхиматозных и стромальных Т-регуляторных лимфоцитов, а также паренхиматозных и стромальных НК-лимфоцитов, снижением уровней экспрессии белков PGRMC1 и Galectin-1, как в строме, так и в паренхиме опухоли.

2. Гамма-облучение вызывает изменение характера взаимозависимостей между изучаемыми характеристиками и клиническим течением эндометриоидной аденокарциномы тела матки: способствует появлению положительных статистически значимых взаимосвязей между

T-регуляторными лимфоцитами, паренхиматозными NK-лимфоцитами и длительностью безрецидивной выживаемости, а также отрицательной зависимостью между прогрессированием опухоли и инфильтрацией стромальными T-регуляторными лимфоцитами.

3. Гамма-облучение вызывает изменения уровней экспрессии белков-регуляторов клеточных процессов в ткани эндометриоидной аденокарциномы тела матки: уровень экспрессии ниже порогового значения Galectin-1 паренхиматозным и стромальным компонентами эндометриоидной аденокарциномы тела матки определяет статистически значимую безрецидивную выживаемость пациенток.

Личный вклад соискателя ученой степени

Постановка проблемы, формулировка целей и задач исследования, положений, выносимых на защиту, внедрение в практику результатов исследования проведены совместно с научным руководителем. Автором единолично выполнен обзор специальной медицинской литературы, произведена выборка медицинской документации 80 пациентов, соответствующих критериям данного исследования. Самостоятельно выполнен весь комплекс исследований гистологических и иммуногистохимических препаратов с использованием светового микроскопа, проведена отработка протоколов иммуногистохимического выявления FoxP3, CD56, Galectin-1, PGRMC1, произведена оценка морфометрических и иммуногистохимических исследований.

Автором создана компьютерная база данных, проведена статистическая обработка с использованием методов непараметрической статистики, произведен анализ и интерпретация полученных результатов, полученные данные изложены в виде диссертационного материала. Определены различия в опухолевом микроокружении при гамма-облучении, выявлены корреляционные связи между клинико-морфологическими показателями и иммуногистохимическими параметрами опухолевого микроокружения у лиц с и без гамма-облучения, произведен анализ безрецидивной выживаемости у пациенток с эндометриоидной аденокарциномой тела матки. Результаты исследования лично получены автором и представлены в статьях в рецензируемых журналах. В совместных публикациях [3, 4, 7] вклад соискателя составил – 95%. В опубликованных статьях [1, 2, 5, 6, 8, 9] вклад диссертанта – 100%.

Апробация диссертации и информация об использовании ее результатов

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на международной конференции «Радиобиология: Современные проблемы» (Гомель, 2019), международной научно-практической конференции «От фундаментальных знаний к «тонкому владению скальпелем»», посвященной памяти профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого (Святителя Луки, архиепископа Симферопольского и Крымского) (Курск, 2019), научно-практической конференции с международным участием студентов и молодых ученых «Актуальные проблемы медицины» (Гомель, 2019), международной конференции молодых ученых «Перспективные направления в онкологии, радиобиологии и радиологии: V конференции молодых учёных, посвященной памяти академика А.Ф. Цыба» (Обнинск, 2019).

Сведения, подтверждающие использование результатов диссертационного исследования, содержатся в 1 акте о внедрении в научно-исследовательский процесс, 1 акте о внедрении результатов в практическое здравоохранение (ОГБУЗ «Смоленский областной институт патологии»), а также 1 акте о внедрении результатов исследования в учебный процесс на кафедре патологической физиологии УО «Гомельский государственный медицинский университет». Получен патент на изобретение № 20799 «Способ гистологической окраски соединительной ткани».

Опубликование результатов диссертации

По теме диссертационного исследования опубликовано: 4 статьи в рецензируемых научных журналах, соответствующих пункту 18 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь (1,87 авторского листа), 2 статьи в сборниках материалов конференций, 3 – в тезисах докладов конференций. Общее количество опубликованных материалов составляет 2,46 авторского листа.

Структура и объем диссертации

Текст диссертации изложен на 116 страницах машинописного текста и состоит из введения, общей характеристики работы, обзора литературы (глава 1), материалов и методов исследования (глава 2), результатов собственных исследований, изложенных в главах 3–5, заключения, библиографического списка (232 источника, из них 21 – на русском языке, 211 – на иностранных языках), собственных публикаций соискателя – 10. Диссертационная работа содержит 66 рисунков, в том числе 9 микрофотографий, 8 таблиц, 1 формулу, 4 приложения.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и методы исследования

Исследование проводилось на базе научно-исследовательской лаборатории УО «Гомельский государственный медицинский университет» и было одобрено Комитетом по биомедицинской этике УО «Гомельский государственный медицинский университет» (протокол № 1 от 15.05.2019). Материалом для исследования стали гистологические блоки 80 пациенток с эндометриоидной аденокарциномой (ЭА) I–III стадии, проходивших лечение в стационарах онкологического профиля г. Гродно и г. Гомеля. На основании анализа медицинской документации все пациентки были разделены на две группы: в первую вошли женщины, страдающие ЭА и получавшие контактную лучевую гамма-терапию в ходе комплексного лечения опухоли (ЛТ+), во вторую вошли пациентки, не получавшие контактную лучевую терапию при проведении комплексного лечения ЭА (ЛТ-).

Характеристика экспрессии иммуногистохимических и морфометрических параметров опухолевого микроокружения ЭА была дана на основе ретроспективного одномоментного сравнительного (случай – контроль) исследования 42 случаев ЛТ+ и 38 случаев ЛТ- группы, прооперированных в 2008–2016 годы. Характеристика клинико-морфологических параметров пациенток с ЭА представлена в таблице 1.

Таблица 1. – Клинико-морфологическая характеристика женщин с ЭА, включенных в исследование

Признаки	Всего	ЭА с лучевой гамма-терапией	ЭА без лучевой гамма-терапии
Количество наблюдений	80	42	38
Возраст (лет)	62,3±9,2	61,0±7,5	63,7±10,8
Степень дифференцировки			
G ₁	22	8	14
G ₂	39	18	21
G ₃	19	16	3
Стадия I по FIGO	62	33	29
Стадия II по FIGO	10	4	6
Стадия III по FIGO	8	5	3

Лечение всех пациенток проводилось в соответствии с протоколами диагностики и лечения онкологических заболеваний Министерства здравоохранения Республики Беларусь. Предоперационную гамма-лучевую брахитерапию проводили ЛТ+ группе. Контактную гамма-лучевую терапию

в суммарной дозе облучения 13,5 Гр выполняли путем предварительного введения в полость матки аппликатора, являющегося источником излучения (изотоп Co^{60}).

Методы исследования

Для выявления антител к Т-регуляторным лимфоцитам использовалось антитело к FoxP3, НК-клетки определялись антителом к CD56, экспрессия белка Galectin-1 определялась с применением антитела к Galectin-1, для определения мембранного компонента прогестеронового рецептора 1 использовались антитела к PGRMC1.

Подсчет клеточных элементов иммунной реакции на новообразование с экспрессией CD56 и FoxP3 проводили в 10-и случайных неперекрывающихся полях зрения при увеличении $\times 400$ в местах наибольшего скопления DAB-позитивных клеток лимфоидного ряда. Далее рассчитывали среднее арифметическое для каждой пациентки. Для расчета количества FoxP3⁺ и CD56⁺ клеток в 1мм^2 паренхимы использовалась формула:

$$N = \frac{\bar{X}n \times 1000000}{72208,864},$$

где N – количество FoxP3⁺ или CD56⁺ клеток в 1мм^2 в паренхиме или строме опухоли;

$\bar{X}n$ – среднее арифметическое количество FoxP3⁺ или CD56⁺ клеток в 10 неперекрывающихся полях зрения при увеличении $\times 400$ в паренхиме или строме опухоли;

72208,864 – площадь одного поля зрения микроскопа при увеличении $\times 400$ (мкм^2).

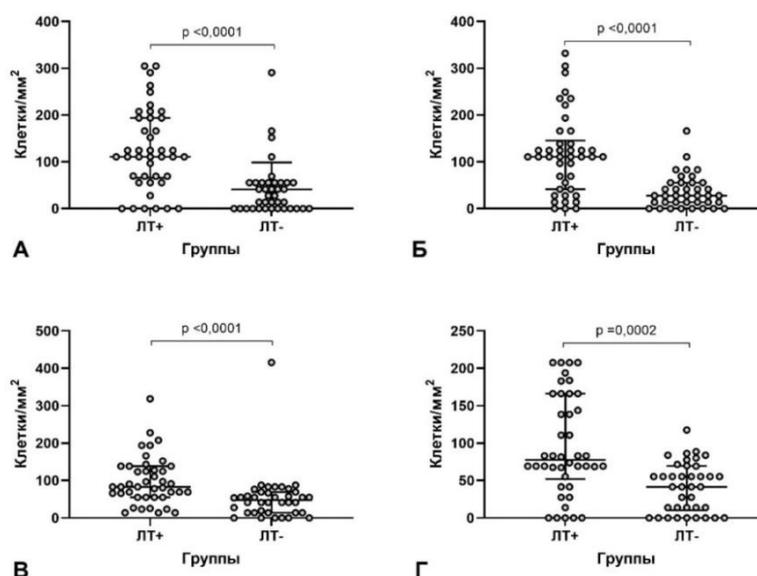
Оценка экспрессии Galectin-1 и PGRMC1 производилась отдельно в 10-и неперекрывающихся полях стромы и паренхимы опухоли. Исходя из количества DAB-позитивных клеток к общему количеству клеток, получали процент позитивных клеток. Результат выражался в среднем для 10-и полей зрения проценте позитивных клеток.

Результаты представлены медианой (Me), 25- и 75-м перцентилями: Me (25%; 75%). Сравнительная характеристика признаков была проведена с использованием непараметрических методов исследования: сравнения двух независимых выборок – U-критерий Манна-Уитни и двухстороннего критерия Фишера. Для сравнения трех групп использовался ANOVA-тест. Взаимосвязь между показателями выявляли методом непараметрического корреляционного анализа Спирмена (r). Оценка силы связей проводилась с

использованием шкалы Чеддока. Для выявления пороговых значений параметров на основании отсутствия либо наличия гамма-облучения использовался ROC-анализ. Безрецидивная выживаемость пациенток оценивалась с использованием метода Каплана-Майера. Достоверность различий сравнивалась при помощи Log-rank теста. Под безрецидивной выживаемостью принимали период от дня проведения оперативного лечения до дня выявления прогрессирования либо смерти от ЭА. Медиана длительности наблюдения пациенток составляла 1362,5 (1013,0; 1555,5) дней. Отношение шансов (ОШ) рассчитывалось как отношение числа случаев, имеющих определенный признак, к числу случаев, в которых данный признак отсутствовал. За уровень статистической значимости принимался $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

В группе, подвергшейся предоперационной лучевой терапии, отмечалось увеличение количества FoxP3⁺ Т-регуляторных лимфоцитов в строме ЭА тела матки, медиана составила 110,8 (69,2; 193,9) клеток/мм². В группе сравнения при микроскопии выявлялось небольшое количество FoxP3⁺ клеток в строме опухоли, медиана была равна 27,8 (0,0; 55,4) клеток/мм². Сравнение групп выявило статистически значимые различия ($p < 0,0001$) в количестве FoxP3⁺ Т-регуляторных лимфоцитов в строме ЭА (рисунок 1А).



А – FoxP3⁺ лимфоциты в строме; Б – FoxP3⁺ лимфоциты в паренхиме;

В – CD56⁺ лимфоциты в строме; Г – CD56⁺ лимфоциты в паренхиме

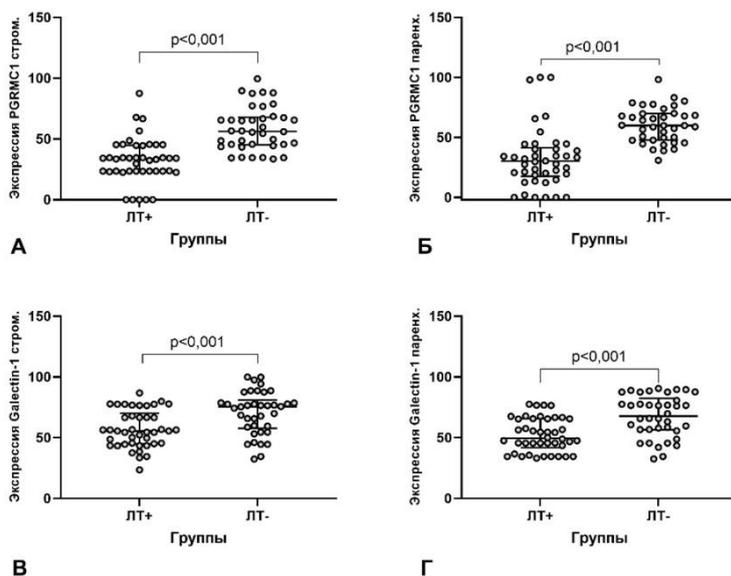
Рисунок 1. – Количественные изменения лимфоцитов в ткани рака тела матки групп исследования

В паренхиме FoxP3⁺ Т-лимфоциты инфильтрировали преимущественно базальные мембраны опухолевых желез. Медиана расположенных в паренхиме FoxP3⁺ клеток в группе с лучевой терапией составляла 110,8 (41,5; 138,5) клеток/мм², в группе сравнения – 27,7 (13,8; 55,4) клеток/мм². При сравнении групп определялись статистически значимые различия ($p < 0,0001$) в количестве FoxP3⁺ Т-регуляторных лимфоцитов (рисунок 1Б).

В строме медиана количества CD56⁺ лимфоцитов в группе с облучением составила 83,1 (55,4; 138,5) клеток/мм², в группе без лучевой терапии медиана была 47,7 (13,8; 69,2) клеток/мм². При сравнении групп определялись статистически значимые различия ($p < 0,0001$) в инфильтрации стромы НК-лимфоцитами (рисунок 1В).

В паренхиме медиана количества позитивных CD56⁺ лимфоцитов в группе с облучением составила 77,7 (55,4; 166,2) клеток/мм², в группе без облучения – 41,5 (13,8; 69,2) клеток/мм². При сравнении групп определялись статистически значимые различия ($p = 0,0002$) в инфильтрации паренхимы НК-лимфоцитами (рисунок 1Г).

В группе пациенток, прошедших гамма-лучевую терапию, медиана экспрессии PGRMC1 в строме ЭА составила 33,9 (23,5; 44,7) %, в группе без лучевой терапии – 56,4 (45,5; 67,5) %. При сравнении экспрессии данного белка в группах с облучением и без облучения выявлялись статистически значимые различия ($p < 0,001$) (рисунок 2А).



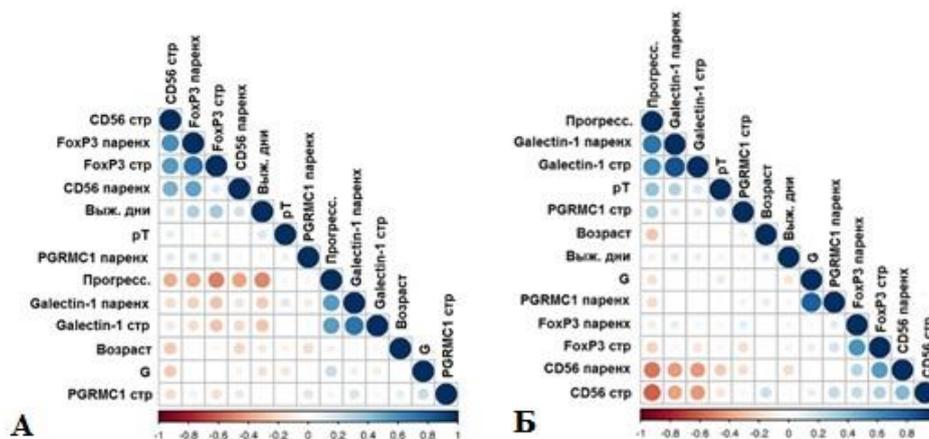
А – экспрессия PGRMC1 в строме; Б – экспрессия PGRMC1 в паренхиме;
 В – экспрессия Galectin-1 в строме; Г – экспрессия Galectin-1 в паренхиме
 Рисунок 2. – Характеристика экспрессии маркеров опухолевой прогрессии
 в группах исследования

Экспрессия PGRMC1 в паренхиматозном компоненте у пациенток первой группы составила 30,1 (18,6; 40,3) %, в группе без облучения – 59,9 (47,7; 69,8) %. При сравнении групп по представленному показателю были выявлены статистически значимые различия ($p < 0,001$) (рисунок 2Б).

В группе случаев ЭА с облучением медиана экспрессии Galectin-1 в строме была 55,6 (45,0; 67,9) %, в группе без облучения – 75,6 (58,7; 78,7) %, при сравнении групп отмечались статистически значимые различия ($p < 0,001$) (рисунок 2В).

Медиана паренхиматозной экспрессии Galectin-1 в случаях ЭА с облучением составила 49,5 (43,5; 65,6) %. В группе без облучения медиана составила 67,8 (56,7; 80,7) %. При сравнении групп по данному показателю отмечались статистически значимые различия ($p < 0,001$) (рисунок 2Г).

Корреляционные взаимосвязи между клинико-морфологическими параметрами ЭА и параметрами опухолевого микроокружения в ЛТ+ группе представлены на рисунке 3А.



CD56 стр – стромальные НК-лимфоциты; CD56 паренх – паренхиматозные НК-лимфоциты; FoxP3 стр – стромальные Т-регуляторные лимфоциты; FoxP3 паренх – паренхиматозные Т-регуляторные лимфоциты; Выж. дни – безрецидивная выживаемость; PGRMC1 стр – стромальная экспрессия PGRMC1; PGRMC1 паренх – паренхиматозная экспрессия PGRMC1; Прогресс. – прогрессирование; Galectin-1 стр – стромальная экспрессия Galectin-1; Galectin-1 паренх – паренхиматозная экспрессия Galectin-1; G – степень дифференцировки

Рисунок 3. – Корреляционные взаимосвязи в: А. ЛТ+ группе; Б. ЛТ- группе

В группе ЛТ+ отмечались слабые положительные корреляционные связи между длительностью безрецидивной выживаемости и стромальной

($p < 0,001$; $r = 0,34$) и паренхиматозной ($p < 0,001$; $r = 0,34$) инфильтрацией опухоли FoxP3⁺ Т-регуляторными лимфоцитами; длительностью безрецидивной выживаемости и паренхиматозной инфильтрацией NK-лимфоцитами ($p < 0,001$; $r = 0,46$). Умеренные положительные корреляционные связи определялись между инфильтрацией FoxP3⁺ Т-регуляторными лимфоцитами и NK-лимфоцитами ($p < 0,001$; $r = 0,60$) паренхимы опухоли; стромальной инфильтрацией FoxP3⁺ Т-регуляторными лимфоцитами и паренхиматозными NK-лимфоцитами ($p < 0,001$; $r = 0,55$), что может быть связано, по нашему мнению, с усилением инфильтрации стромального и паренхиматозного компартментов ЭА в целом. Умеренные положительные взаимосвязи отмечались между прогрессированием ЭА и паренхиматозной ($p < 0,001$; $r = 0,55$) и стромальной ($p < 0,001$; $r = 0,54$) экспрессией Galectin-1. Выраженные положительные корреляционные связи отмечались между паренхиматозной и стромальной экспрессией Galectin-1 ($p < 0,001$; $r = 0,72$), а также между паренхиматозной и стромальной инфильтрацией FoxP3⁺ клетками ($p < 0,001$; $r = 0,75$). Умеренная отрицательная корреляционная связь наблюдалась между прогрессированием ЭА и стромальной инфильтрацией Т-регуляторными FoxP3⁺ лимфоцитами ($p < 0,001$; $r = -0,51$). Слабые отрицательные корреляционные связи имелись между прогрессированием заболевания и паренхиматозной инфильтрацией NK-лимфоцитами ($p < 0,001$; $r = -0,37$); паренхиматозной инфильтрацией Т-регуляторными FoxP3⁺ лимфоцитами ($p < 0,001$; $r = -0,40$); стромальной инфильтрацией NK-лимфоцитами ($p < 0,001$; $r = -0,41$); а также длительностью безрецидивной выживаемости ($p < 0,001$; $r = -0,49$).

Корреляционные взаимосвязи между клинико-морфологическими параметрами ЭА и параметрами опухолевого микроокружения в ЛТ- группе представлены на рисунке 3Б.

В группе ЛТ- отмечались слабые положительные корреляционные связи между размером опухоли (Т) и прогрессированием ($p < 0,001$; $r = 0,39$); размером опухоли и паренхиматозной экспрессией Galectin-1 ($p < 0,001$; $r = 0,30$); стромальной экспрессией PGRMC1 и прогрессированием ЭА ($p < 0,001$; $r = 0,46$); паренхиматозной инфильтрацией опухоли FoxP3⁺ Т-регуляторными лимфоцитами и стромальной инфильтрацией NK-лимфоцитами ($p < 0,001$; $r = 0,30$); стромальной и паренхиматозной инфильтрацией NK-лимфоцитами ($p < 0,001$; $r = 0,43$). Умеренные положительные корреляционные связи определялись между: прогрессированием ЭА и стромальной экспрессией Galectin-1 ($p < 0,001$; $r = 0,63$); стромальной инфильтрацией FoxP3⁺ Т-регуляторными лимфоцитами

и паренхиматозными NK-лимфоцитами ($p < 0,001$; $r = 0,58$); стромальной инфильтрацией FoxP3⁺ Т-регуляторными лимфоцитами и паренхиматозными NK-лимфоцитами ($p < 0,001$; $r = 0,55$). Выраженные положительные корреляционные связи отмечались между паренхиматозной и стромальной экспрессией Galectin-1 ($p < 0,001$; $r = 0,86$); прогрессированием ЭА и паренхиматозной экспрессией Galectin-1 ($p < 0,001$; $r = 0,72$), а также между паренхиматозной экспрессией PGRMC1 и степенью дифференцировки ЭА ($p < 0,001$; $r = 0,81$). Слабые отрицательные корреляционные связи выявлены между паренхиматозной экспрессией Galectin-1 и паренхиматозной инфильтрацией NK-лимфоцитами ($p < 0,001$; $r = -0,43$); стромальной экспрессией Galectin-1 и паренхиматозной инфильтрацией NK-лимфоцитами ($p < 0,001$; $r = -0,44$); паренхиматозной экспрессией Galectin-1 и стромальной инфильтрацией NK-лимфоцитами ($p < 0,001$; $r = -0,41$); стромальной экспрессией Galectin-1 и стромальной инфильтрацией NK-лимфоцитами ($p < 0,001$; $r = -0,43$). Умеренная отрицательная корреляционная связь наблюдалась между: прогрессированием ЭА и паренхиматозной инфильтрацией NK-лимфоцитами ($p < 0,001$; $r = -0,54$); прогрессированием опухоли и стромальной инфильтрацией NK-лимфоцитами ($p < 0,001$; $r = -0,60$).

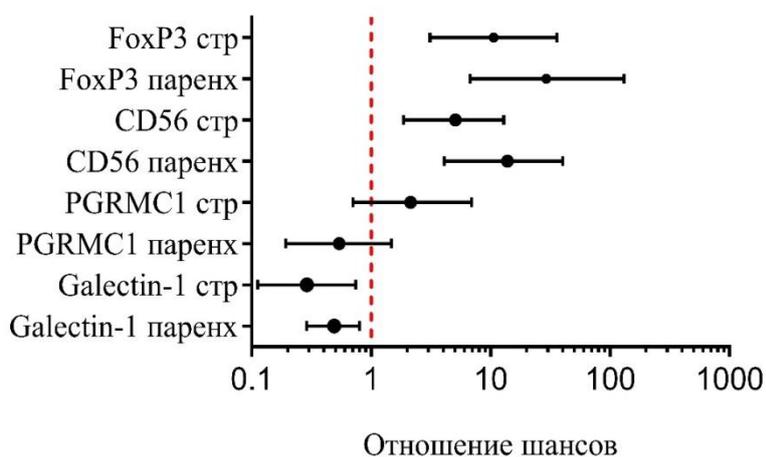
Использование метода ROC-анализа позволило выявить пороговые значения, чувствительность и специфичность исследуемых показателей. Полученные данные представлены в таблице 2.

Таблица 2. – Результаты ROC-анализа для исследуемых параметров

Параметр	AUC (95% ДИ)	p	Пороговое значение	Чувствительность (95% ДИ)	Специфичность (95% ДИ)
FoxP3 ⁺ строма	0,653 (0,534–0,772)	0,015	124,6	91,3% (78,1–98,3%)	34,8% (21,0–50,9%)
FoxP3 ⁺ паренхима	0,586 (0,460–0,712)	0,18	110,8	89,2% (74,6–97,0%)	34,9% (21,0–50,9%)
CD56 ⁺ строма	0,644 (0,524–0,765)	0,019	69,2	81,1% (64,8–92,0%)	46,5% (31,2–62,3%)
CD56 ⁺ паренхима	0,630 (0,508–0,751)	0,004	69,2	78,4% (61,8–90,2%),	39,6% (25,0–55,6%)
PGRMC1 строма	0,531 (0,401–0,660)	0,640	45,5	64,8% (47,5–79,8%),	48,8% (33,3–64,5%)
PGRMC1 паренхима	0,609 (0,484–0,734)	0,080	65,6	89,2% (74,6–97,0%)	34,9% (21,0–50,9%)
Galectin-1 строма	0,782 (0,678–0,885)	<0,001	65,9	75,7% (58,8–88,2%)	74,4% (58,8–86,5%)
Galectin-1 паренхима	0,786 (0,681–0,892)	<0,001	60,7	75,7% (58,8–88,2%)	81,4% (66,6–91,6 %)

При анализе стромальной инфильтрации FoxP3⁺ лимфоцитами относительно полученного порогового значения в ЛТ⁺ и ЛТ⁻ группах были выявлены статистически значимые различия ($p < 0,0001$).

Проведение гамма-лучевой терапии приводило к увеличению в 10,61 раза шанс (рисунок 4) стромальной инфильтрации FoxP3⁺ лимфоцитами выше порогового значения (ОШ = 10,61 95% ДИ 3,105–35,89).



FoxP3 стр – FoxP3⁺ лимфоциты в строме; **FoxP3 паренх** – FoxP3⁺ лимфоциты в паренхиме; **CD56 стр** – CD56⁺ лимфоциты в строме; **CD56 паренх** – CD56⁺ лимфоциты в паренхиме; **PGRMC1 стр** – экспрессия PGRMC1 в строме; **PGRMC1 паренх** – экспрессия PGRMC1 в паренхиме; **Galectin-1 стр** – экспрессия Galectin-1 в строме; **Galectin-1 паренх** – экспрессия Galectin-1 в паренхиме

Рисунок 4. – Отношение шансов при значениях параметров выше пороговых

Анализ безрецидивной выживаемости на основании полученного порогового значения стромальной инфильтрации FoxP3⁺ лимфоцитами не выявил статистически значимых различий ($p = 0,067$).

При анализе паренхиматозной инфильтрации FoxP3⁺ лимфоцитами относительно полученного порогового значения в ЛТ⁺ и ЛТ⁻ группах отмечались статистически значимые различия ($p < 0,0001$).

Проведение гамма-лучевой терапии приводило к увеличению в 29,25 раза шанс (рисунок 4) паренхиматозной инфильтрации FoxP3⁺ лимфоцитами выше порогового значения (ОШ = 29,25 95% ДИ 6,725–130,900). Изучение паренхиматозной инфильтрации FoxP3⁺ лимфоцитами показало, что при исследовании безрецидивной выживаемости на основании полученного порогового значения не было выявлено статистически значимых различий ($p = 0,098$).

При анализе стромальной инфильтрации CD56⁺ лимфоцитами относительно полученного порогового значения в ЛТ⁺ и ЛТ⁻ группах были выявлены статистически значимые различия ($p=0,0008$).

Проведение гамма-лучевой терапии приводило к увеличению в 5,06 раза шанс (рисунок 4) стромальной инфильтрации выше порогового значения CD56⁺ лимфоцитами (ОШ = 5,065 95% ДИ 1,864–12,940). Анализ безрецидивной выживаемости на основании полученного порогового значения стромальной инфильтрации CD56⁺ лимфоцитами не выявил статистически значимых различий ($p=0,106$).

При анализе паренхиматозной инфильтрации CD56⁺ лимфоцитами относительно полученного порогового значения в ЛТ⁺ и ЛТ⁻ группах отмечались статистически значимые различия ($p<0,001$).

Проведение гамма-лучевой терапии приводило к увеличению в 13,81 раза шанс (рисунок 4) паренхиматозной инфильтрации CD56⁺ лимфоцитами выше порогового значения (ОШ = 13,81 95% ДИ 4,087–40,12). Изучение паренхиматозной инфильтрации CD56⁺ лимфоцитами показало, что при исследовании безрецидивной выживаемости на основании полученного порогового значения не было выявлено статистически значимых различий ($p=0,347$).

При анализе стромальной экспрессии PGRMC1 относительно полученного порогового значения в ЛТ⁺ и ЛТ⁻ группах не были выявлены статистически значимые различия ($p=0,263$).

Проведение гамма-лучевой терапии не влияло на стромальную экспрессию PGRMC1 относительно порогового значения (ОШ = 2,143 95% ДИ 0,705–6,938) (рисунок 4). Анализ безрецидивной выживаемости на основании полученного порогового значения стромальной экспрессии PGRMC1 не выявил статистически значимых различий ($p=0,337$).

При анализе паренхиматозной экспрессии PGRMC1 относительно полученного порогового значения в ЛТ⁺ и ЛТ⁻ группах отмечались статистически значимые различия ($p=0,003$).

Проведение гамма-лучевой терапии не влияло на паренхиматозную экспрессию PGRMC1 относительно порогового значения (ОШ = 0,542 95% ДИ 0,193–1,478) (рисунок 4). Изучение паренхиматозной экспрессии PGRMC1 показало, что при исследовании безрецидивной выживаемости на основании полученного порогового значения не было выявлено статистически значимых различий ($p=0,119$).

При анализе стромальной экспрессии Galectin-1 относительно полученного порогового значения в ЛТ+ и ЛТ- группах были выявлены статистически значимые различия ($p=0,013$).

Проведение гамма-лучевой терапии в 3,46 (1/0,289) раза (рисунок 4) снижало шанс стромальной экспрессии Galectin-1 выше порогового значения (ОШ = 0,289 95% ДИ 0,112–0,742). Анализ безрецидивной выживаемости на основании полученного порогового значения стромальной экспрессии Galectin-1 выявил статистически значимые различия ($p<0,001$).

При анализе паренхиматозной экспрессии Galectin-1 относительно полученного порогового значения в ЛТ+ и ЛТ- группах отмечались статистически значимые различия ($p=0,007$).

Проведение гамма-лучевой терапии снижало в 2,04 (1/0,490) раза (рисунок 4) шанс паренхиматозной экспрессии Galectin-1 ниже порогового значения (ОШ=0,490 95% ДИ 0,288–0,800). Изучение паренхиматозной экспрессии Galectin-1 показало, что при исследовании безрецидивной выживаемости на основании полученного порогового значения были выявлены статистически значимые различия ($p<0,001$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Комплекс параметров опухолевого микроокружения эндометриоидной аденокарциномы тела матки после воздействия гамма-облучения, характеризуется увеличением количества паренхиматозных ($p<0,0001$) и стромальных ($p<0,0001$) FoxP3⁺ Т-регуляторных лимфоцитов, паренхиматозных ($p<0,0001$) и стромальных ($p<0,0002$) CD56⁺ НК-лимфоцитов, а также снижением уровня экспрессии белков PGRMC1 и Galectin-1, как в строме ($p<0,001$), так и в паренхиме ($p<0,001$) опухоли [1, 2, 5, 7, 8].

2. Воздействие гамма-облучения вызывает изменение характера взаимозависимостей между исследуемыми параметрами опухолевого микроокружения эндометриоидной аденокарциномы тела матки и клиническим течением заболевания, что проявляется появлением положительных статистически значимых взаимосвязей между инфильтрацией FoxP3⁺ Т-лимфоцитами ($p<0,001$; $r=0,34$), паренхиматозными НК-лимфоцитами ($p<0,001$; $r=0,46$) и длительностью безрецидивной выживаемости, а также отрицательной зависимостью между

прогрессированием эндометриоидной аденокарциномы и инфильтрацией стромальными FoxP3⁺ Т-лимфоцитами ($p < 0,001$; $r = -0,51$) [3, 9].

3. Экспрессия ниже порогового значения Galectin-1 паренхиматозным (ОШ = 0,490 95% ДИ 0,288–0,800) и стромальным (ОШ = 0,289 95% ДИ 0,112–0,742) компонентами после проведения гамма-облучения определяет статистически значимую безрецидивную выживаемость пациенток с эндометриоидной аденокарциномой, что является фактором благоприятного течения заболевания [4, 6].

4. Таким образом, суммируя вышеизложенное можно констатировать, что выявленный комплекс изменений опухолевого микроокружения под влиянием гамма-излучения, принимает участие в формировании индивидуальной радиочувствительности пациенток [1, 3, 4].

Рекомендации по практическому использованию результатов

1. Выявленные различия в опухолевом микроокружении эндометриоидной аденокарциномы у пациенток, подвергшихся предоперационной контактной гамма-лучевой терапии, могут быть использованы в дальнейшем для разработки комбинированных методов лучевой и иммунотерапии данного заболевания [1, 2, 5, 7, 8].

2. Пороговые значения экспрессии FoxP3, CD56, Galectin-1 и PGRMC1 опухолевым микроокружением могут быть использованы как маркеры эффекта противоопухолевой вакцинации *in situ* при проведении гамма-лучевой терапии [4, 6].

3. Определение экспрессии стромой и паренхимой Galectin-1 может быть использовано для разработки модели прогнозирования клинического течения эндометриоидной аденокарциномы [4, 6].

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ

Статьи в научных журналах

1. Зиновкин, Д.А. Постлучевые изменения опухолевого микроокружения эндометриоидной аденокарциномы тела матки / Д.А. Зиновкин // Проблемы здоровья и экологии. – 2019. – Т. 61, № 3. – С. 66–70.

2. Зиновкин, Д.А. Реактивные изменения иммунного компонента опухолевого микроокружения эндометриоидной аденокарциномы эндометрия в ответ на гамма-облучение ткани опухоли / Д.А. Зиновкин, Э.А. Надыров // Известия ГГУ им. Ф. Скорины. – 2019. – Т. 117, № 6. – С. 41–45.

3. Зиновкин, Д.А. Корреляционные взаимосвязи опухолевого микроокружения эндометриоидной аденокарциномы эндометрия у лиц с и без предоперационной гамма-лучевой терапией / Д.А. Зиновкин, Э.А. Надыров // Онкологический журнал. – 2019. – Т. 13, № 4 (52). – С. 18–23.

4. Зиновкин, Д.А. Реакция опухолевого микроокружения на лучевую терапию: анализ безрецидивной выживаемости пациенток с эндометриоидной аденокарциномой / Д.А. Зиновкин, Э.А. Надыров // Проблемы здоровья и экологии. – 2019. – Т. 62, № 4. – С. 38–43.

Статьи в сборниках материалов конференций

5. Зиновкин, Д.А. Влияние гамма-облучения на инфильтрацию FoxP3+ T- и CD56+ NK-лимфоцитов в строме эндометриоидной аденокарциномы тела матки / Д.А. Зиновкин // Конгресс Российского общества рентгенологов и радиологов: материалы науч.-практ. конф. междунар. участием, Москва, 6–8 нояб. 2019 г. / под ред. В.И. Синицына. – Москва, 2019. – С. 70–71.

6. Зиновкин, Д. А. Стромальная экспрессия PGRMC1 и Galectin-1 эндометриоидной аденокарциномой эндометрия при воздействии ионизирующего излучения/ Д. А. Зиновкин // OpenBio 2019: материалы VI Международная конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов, Кольцово, 22–25 окт. 2019 г.: сборник тезисов. – Кольцово, 2019. – С. 505–506.

Тезисы докладов

7. Зиновкин, Д. А. Экспрессия PGRMC1 и Galectin-1 паренхиматозным компонентом эндометриоидной аденокарциномой эндометрия при воздействии предоперационной гамма-лучевой терапией / Д. А. Зиновкин,

И. В. Бильский // От фундаментальных знаний к тонкому владению скальпелем: материалы Международной научно-практической конференции, посвященной памяти профессора В. Ф. Войно-Ясенецкого (Святителя Луки, архиепископа Симферопольского и Крымского), Курск, 3–4 окт. 2019 г. / под ред. В. А. Лазаренко. – Курск, 2019. – С. 97–99.

8. Зиновкин, Д.А. Анализ выживаемости пациенток на основании параметров опухолевого микроокружения эндометриоидной аденокарциномы тела матки / Д.А. Зиновкин // Актуальные проблемы медицины: сб. ст. Республик. науч.-практ. конф. с междунар. участием студентов и молод. ученых, Гомель, 21–22 нояб. 2019 г.: в 5-и т. / Гомельск. гос. мед. ун-т; под ред. А.Н. Лызикова. – Гомель, 2019. – Т. 2. – С. 139–141.

9. Зиновкин, Д. А. Особенности взаимосвязей опухолевого микроокружения эндометриоидной аденокарциномы тела матки у лиц, получавших и не получавших предоперационную контактную гамма-лучевую терапию / Д. А. Зиновкин // Перспективные направления в онкологии, радиобиологии и радиологии: материалы V конференции молодых учёных, посвященная памяти академика А. Ф. Цыба, Обнинск, 29 нояб. 2019 г. / под ред. А. А. Карпова. – Обнинск, 2019. – С. 65–66.

Патент на изобретение

10. Способ гистологической окраски соединительной ткани: пат. 20799 Респ. Беларусь: МПК G 01N 1/30 (2006.01) / Д. А. Зиновкин, С. А. Гуреев, А. Н. Лызиков, Э. А. Надыров; заявители и патентообладатели: Респ. науч.-практ. центр радиационной медицины и экологии человека, Гомел. гос. мед. ун-т. – № а 20160006; заявл. 10.03.2014; опубл. 28.02.2017.

РЭЗЮМЭ

Зіноўкін Дзмітрый Аляксандравіч

Уплыў гама-апраменьвання на морфафункцыянальную характарыстыку пухліннага мікраакружэння эндаметрыяднай адэнакарцыномы цела маткі

Ключавыя словы: гама-выпраменьванне, пухліннае мікраакружэнне, эндаметрыядная адэнакарцынома, імунагістахімія, Т-рэгулятарныя лімфацыты, NK-лімфацыты, FoxP3, CD56, PGRMC1, Galectin-1, парэнхіма пухліны, строма пухліны

Мэта даследавання: выявіць змены пухліннага мікраакружэння эндаметрыяднай адэнакарцыномы цела маткі ў адказ на гама-апрамяненне, а таксама ўсталяваць іх ролю ў безрэцыдыўнай выжывальнасці жанчын з дадзеным захворваннем.

Аб'ект даследавання: тканіны эндаметрыяднай адэнакарцыномы I–III стадыі асоб, якія падвяргаліся і якія не падвяргаліся перадаперацыйнай гама-прамянёвай тэрапіі.

Метады даследавання: марфалагічныя з прымяненнем імунагістахіміі, статыстычныя.

Выкарыстаная апаратура: мікраскоп Nikon Eclipse 50i з лічбавай камерай DS-F1(Nikon, Японія).

Атрыманыя вынікі і іх навізна: гама-апрамяненне прыводзіць да статыстычна значнага павелічэння колькасці FoxP3⁺ і CD56⁺ лімфацытаў як у строме, так і ў парэнхіме эндаметрыяднай адэнакарцыномы, а таксама зніжэння страмальнай і парэнхіматозной экспрэсіі PGRMC1 і Galectin-1. Страмальная і парэнхіматозная экспрэсія Galectin-1 з'яўляецца прэдыктарам прагнозу.

Рэкамендацыі па выкарыстанні: выяўленыя адрозненні ў пухлінным мікраакружэнні эндаметрыяднай адэнакарцыномы ў асоб, якія падвергліся перадаперацыйнай кантактнай гама-прамянёвай тэрапіі, могуць быць выкарыстаны ў далейшым для распрацоўкі камбінаваных метадаў прамянёвай і імунатэрапіі дадзенага захворвання. Парогавыя значэння экспрэсіі FoxP3, CD56, Galectin-1 і PGRMC1 пухліннага мікраакружэння могуць быць выкарыстаны як маркёры радыёадчувальнасці эндаметрыяднай адэнакарцыномы ў адказ на гама-апрамяненне.

Вобласць прымянення: вынікі даследавання могуць быць выкарыстаны ў практычнай і навукова-даследчай дзейнасці радыёбіёлагамі, лекарамі-радыёлагамі, паталагаанатамамі і лекарамі-анколагамі.

РЕЗЮМЕ

Зиновкин Дмитрий Александрович

**Влияние гамма-излучения на морфофункциональную
характеристику опухолевого микроокружения эндометриоидной
аденокарциномы тела матки**

Ключевые слова: гамма-излучение, опухолевое микроокружение, эндометриоидная аденокарцинома, иммуногистохимия, Т-регуляторные лимфоциты, NK-лимфоциты, FoxP3, CD56, PGRMC1, Galectin-1, паренхима опухоли, строма опухоли.

Цель исследования: выявить изменения опухолевого микроокружения эндометриоидной аденокарциномы тела матки в ответ на гамма-облучение, а также установить их роль в безрецидивной выживаемости женщин с данным заболеванием.

Объект исследования: ткани эндометриоидной аденокарциномы I–III стадии лиц, подвергавшихся и не подвергавшихся предоперационной гамма-лучевой терапии.

Методы исследования: морфологические с применением иммуногистохимии, статистические.

Использованная аппаратура: микроскоп Nikon Eclipse 50i с цифровой камерой DS-F1 (Nikon, Япония).

Полученные результаты и их новизна: Гамма-облучение приводит к статистически значимому увеличению количества FoxP3⁺ и CD56⁺ лимфоцитов как в строме, так и в паренхиме эндометриоидной аденокарциномы, а также снижению стромальной и паренхиматозной экспрессии PGRMC1 и Galectin-1. Стромальная и паренхиматозная экспрессия Galectin-1 является предиктором прогноза.

Рекомендации по использованию: Выявленные различия в опухолевом микроокружении эндометриоидной аденокарциномы у лиц, подвергшихся предоперационной контактной гамма-лучевой терапии, могут быть использованы в дальнейшем для разработки комбинированных методов лучевой и иммунотерапии данного заболевания. Пороговые значения экспрессии FoxP3, CD56, Galectin-1 и PGRMC1 опухолевого микроокружения могут быть использованы как маркеры радиочувствительности эндометриоидной аденокарциномы в ответ на гамма-облучение.

Область применения: результаты исследования могут быть использованы в практической и научно-исследовательской деятельности радиобиологами, врачами-радиологами, патологоанатомами и врачами-онкологами.

SUMMARY

Zinovkin Dmitry Aleksandrovich

The influence of gamma irradiation on the morphofunctional characteristics of the tumor microenvironment of endometrioid adenocarcinoma of the uterine body

Keywords: gamma radiation, tumor microenvironment, endometrioid adenocarcinoma, immunohistochemistry, T-regulatory lymphocytes, NK-lymphocytes, FoxP3, CD56, PGRMC1, Galectin-1, tumor parenchyma, tumor stroma.

Objective: to identify changes in the tumor microenvironment of endometrioid adenocarcinoma of the uterine body in response to gamma-irradiation, and to determine their role in the recurrence-free survival rate in women with the disease.

The object of the study: the tissues of endometrioid adenocarcinoma of stage I-III uterine corpus in subjects who have and have not undergone preoperative gamma-ray irradiation.

Equipment used: Nikon Eclipse 50i microscope with digital camera DS-F1 (Nikon, Japan).

Results and innovations: Gamma irradiation statistically significant increases infiltration by FoxP3⁺ and CD56⁺ lymphocytes in both stroma and parenchyma of endometrioid adenocarcinoma, also it decreases of stromal and parenchymatous expression of PGRMC1 and Galectin-1. Stromal and parenchymatous expression of Galectin-1 is a possible predictor of prognosis.

Recommended practice: The revealed differences in the tumor microenvironment of endometrioid adenocarcinoma in persons undergoing preoperative contact gamma-ray therapy can be used in the future to develop combined methods of radiation and immunotherapy for this disease. Expression thresholds FoxP3, CD56, Galectin-1 and PGRMC1 of tumor microenvironment can be used as markers of endometrioid adenocarcinoma radiosensitivity in response to gamma radiation.

Scope: the results of the study can be used in practice and research activities of radiobiologists, radiologists, pathologists and oncologists.

Научное издание

Зиновкин Дмитрий Александрович

**ВЛИЯНИЕ ГАММА-ИЗЛУЧЕНИЯ
НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНУЮ ХАРАКТЕРИСТИКУ
ОПУХОЛЕВОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ ЭНДОМЕТРИОИДНОЙ
АДЕНОКАРЦИНОМЫ ТЕЛА МАТКИ**

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук
по специальности 03.01.01 — радиобиология

Подписано в печать 16.11.2021.
Формат 60×84¹/₁₆. Бумага офсетная 80 г/м². Гарнитура «Таймс».
Усл. печ. л. 1,40. Уч.-изд. л. 1,53. Тираж 60 экз. Заказ № 523.

Издатель и полиграфическое исполнение:
учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет».
Свидетельство о государственной регистрации издателя,
изготовителя, распространителя печатных изданий № 1/46 от 03.10.2013.
ул. Ланге, 5, 246000, Гомель.