

DOI: <https://doi.org/10.46879/ukroj.4.2023.285-302>

УДК: [616.008.616.61-006.6](https://doi.org/10.46879/ukroj.4.2023.285-302)



Прогностичне значення панелі імуногістохімічних маркерів для визначення ризику рецидиву та прогресування неінвазивного раку сечового міхура

Титов Є.В.¹, <https://orcid.org/0000-0002-1999-3052>, e-mail: titovevgeniy@ukr.net
Яковцова І.І.¹, <https://orcid.org/0000-0002-1027-9215>, e-mail: docpathomorph@gmail.com
Івахно І.В.¹, <https://orcid.org/0000-0002-5229-0068>, e-mail: igorv.ivakhno@gmail.com
Негодуйко В.В.^{1,2}, <https://orcid.org/0000-0003-4540-5207>, e-mail: vol-ramzes13@ukr.net
Макаров В.В.^{1,2}, <https://orcid.org/0000-0002-4224-0294>, e-mail: docvvmakarov@gmail.com
Панасенко С.І.^{2,3}, <https://orcid.org/0000-0003-2952-1670>, e-mail: pansi@ukr.net

¹Харківський національний медичний університет
Міністерства охорони здоров'я України, Харків, Україна
²Військово-медичний клінічний центр Північного регіону
Міністерства оборони України, Харків, Україна
³Полтавський державний медичний університет
Міністерства охорони здоров'я України, Полтава, Україна

Prognostic value of a panel of immunohistochemical markers for determining the risk of recurrence and progression of non-invasive bladder cancer

Tytov E.V.¹, <https://orcid.org/0000-0002-1999-3052>, e-mail: titovevgeniy@ukr.net
Yakovtsova I.I.¹, <https://orcid.org/0000-0002-1027-9215>, e-mail: docpathomorph@gmail.com
Ivakhno I.V.¹, <https://orcid.org/0000-0002-5229-0068>, e-mail: igorv.ivakhno@gmail.com
Nehoduiko V.V.^{1,2}, <https://orcid.org/0000-0003-4540-5207>, e-mail: vol-ramzes13@ukr.net
Makarov V.V.^{1,2}, <https://orcid.org/0000-0002-4224-0294>, e-mail: docvvmakarov@gmail.com
Panassenko S.I.^{2,3}, <https://orcid.org/0000-0003-2952-1670>, e-mail: pansi@ukr.net

¹Kharkiv National Medical University
of the Ministry of Health of Ukraine, Kharkiv, Ukraine
²Military Medical Clinical Center of the Northern Region
of the Ministry of Defense of Ukraine, Kharkiv, Ukraine
³Poltava State Medical University
of the Ministry of Health of Ukraine, Poltava, Ukraine

Ключові слова:

імуногістохімічні маркери, рецидив, рак сечового міхура.

Для кореспонденції:

Негодуйко Володимир Володимирович
Харківський національний медичний університет
Міністерства охорони здоров'я України;
просп. Науки, буд. 4., м. Харків, Україна, 61022;
e-mail: vol-ramzes13@ukr.net

© Титов Є.В., Яковцова І.І., Івахно І.В.,
Негодуйко В.В., Макаров В.В.,
Панасенко С.І., 2023

РЕЗЮМЕ

Актуальність. Для діагностики та прогнозу клінічного перебігу неінвазивного уротеліального раку сечового міхура (НУРСМ) існує величезна кількість алгоритмів, заснованих як на клініко-морфологічних ознаках, так і на даних імуногістохімічних (ІГХ) досліджень з використанням великої кількості маркерів, зокрема p53, Ki-67, VEGF, Е-кадгерин, MMP, bcl та ін. Науковий та практичний інтерес представляє комплексна оцінка прогностичного значення ряду основних маркерів ІГХ, які використовуються для діагностики та прогнозування раку сечового міхура, впливу процесів епітеліально-мезенхімальної трансформації (ЕМТ) та імунної відповіді на ризик рецидиву та пухлинної прогресії.

Мета роботи – вивчити прогностичне значення панелі маркерів ІГХ для визначення ризику рецидиву, прогресування НУРСМ.

Матеріали і методи. Матеріал був представлений хірургічно видаленими уротеліальними раками сечового міхура ступеня інвазії Т1 (проростання пухлини у підслизовий шар без інвазії у м'язовий) у 42 хворих. Під рецидивом передбачалося виникнення пухлини протягом 5 років після оперативного лікування. Термін «прогресія» означав проростання пухлини в м'язовий шар, тобто перехід пухлини з м'язово-неінвазивного в м'язово-інвазивний, що має велике прогностичне значення для даного виду раку. Дослідження ІГХ проводили з використанням первинних моноклональних антитіл (МСАТ) виробництва ДАКО (Данія), готових до використання до p53, p63, Ki67, Е-кадгерину, N-кадгерину, СК7, СК20, віментину (VimentinV9), MMP-9, TGF-β1, VEGF, CD34+, CD3+, CD4+, CD8+, CD20+, CD68+, колагену IV. Для вивчення процесів ЕМТ використовували епітеліальні

маркери (Е-кадгерин, цитокератини 20 (CK20) та 7 (CK7) та мезенхімальні маркери (N-кадгерин і віментин). Статистичну обробку результатів дослідження проводили за допомогою пакета Statistica 6.0.

Результати та їх обговорення. Виявлено, що прогностичне значення рецидиву НУРСМ мають такі маркери: p53, CD3+, CD8+, CD68+; рецидиву з прогресуванням: Ki-67 та MMP-9. У міру зниження диференціювання НУРСМ ми спостерігали збільшення експресії віментину, Ki-67, MMP-9, VEGF, CD3+, CD8+, CD68+, p53, CD34 та зниження експресії Е-кадгерину, СК20, колагену IV, p63.

Ми встановили взаємозв'язок між клінічною поведінкою процесів НУРСМ та ЕМТ. Так, для раку з рецидивами, але без прогресування характерна 1 стадія ЕМТ ($p < 0,05$), а для НУРСМ з рецидивами та прогресуванням – 2 стадія ЕМТ ($p < 0,05$). Доведено асоціацію ЕМТ з імуноклітинною інфільтрацією НУРСМ. Поява ЕМТ при НУРСМ асоційована з наростанням вираженості інфільтрації CD68+ макрофагами ($p < 0,01$), CD3+Т-лімфоцитами ($p < 0,05$), у тому числі як CD8+ ($p < 0,01$), так і CD4+ ($p < 0,05$) клітинами.

Висновки. Для раку з рецидивом без прогресування характерна ЕМТ 1-ї стадії пухлинних клітин ($p < 0,05$), а для НУРСМ з рецидивом та прогресуванням – ЕМТ 2-ї стадії ($p < 0,05$). Доведено асоціацію ЕМТ з імуноклітинною інфільтрацією НУРСМ. Поява ЕМТ при НУРСМ асоційована з наростанням вираженості інфільтрації CD68+ макрофагами ($p < 0,01$), CD3+Т-лімфоцитами ($p < 0,05$), у тому числі як CD8+ ($p < 0,01$), так і CD4+ ($p < 0,05$) клітинами.

Для цитування:

Титов С.В., Яковцова І.І., Івахно І.В., Негодуйко В.В., Макаров В.В., Панасенко С.І. Прогностичне значення панелі імунгістохімічних маркерів для визначення ризику рецидиву та прогресування неінвазивного раку сечового міхура. *Український радіологічний та онкологічний журнал*. 2023. Т. 31. № 4. С. 285–302. DOI: <https://doi.org/10.46879/ukroj.4.2023.285-302>

Key words:

immunohistochemical markers, recurrence, bladder cancer.

For correspondence:

Nehoduiko Volodymyr Volodymyrovych
Kharkiv National Medical University of the
Ministry of Health of Ukraine;
4, Nauky Ave., Kharkiv, Ukraine, 61022;
e-mail: vol-ramzes13@ukr.net

© Tytov YeV, Yakovtsova II, Ivakhno IV,
Nehoduiko VV, Makarov VV.,
Panasenko S.I., 2023

ABSTRACT

Background. There is a huge number of algorithms for the diagnosis and prognosis of the clinical course of non-invasive bladder cancer (NIBC). They are based on both clinical and morphological features and data from immunohistochemical (IHC) studies in which a large number of markers, including p53, Ki-67, VEGF, E-cadherin, MMP, bcl, etc., were used. Of scientific and practical interest is a comprehensive assessment of the prognostic value of a number of the main IHC markers used for the diagnosis and prognosis of bladder cancer, the impact of epithelial-mesenchymal transition (EMT) processes and the immune response on the risk of recurrence and tumor progression.

Purpose. To study the prognostic value of the panel of IHC markers for determining the risk of recurrence and progression of NIBC.

Materials and Methods. We studied surgically removed stage T1 malignant bladder tumors that spread to the submucosal tissue without invasion into the muscle tissue in 42 patients. Recurrence was understood as tumor development within 5 years after surgical treatment. The term «progression» meant the growth of the tumor in the muscle tissue, in other words, transformation of the tumor from non-muscle-invasive to muscle-invasive, which is of great prognostic significance for this type of cancer. IHC study was performed using primary ready-to-use monoclonal antibodies produced by DAKO (Denmark) for p53, p63, Ki67, E-cadherin, N-cadherin, CK7, CK20, Vimentin (VimentinV9), MMP-9, TGF- β 1, VEGF, CD34+, CD3+, CD4+, CD8+, CD20+, CD68+, collagen IV. Epithelial markers (E-cadherin, cytokeratins 20 (CK20) and 7 (CK7)) and mesenchymal markers (N-cadherin and vimentin) were used to study EMT processes. Statistical processing of the research results was performed using the Statistica 6.0 package.

Results and Discussion. It was found that the following markers may have prognostic value for the recurrence of NIBC: p53, CD3+, CD8+, CD68+; for recurrence with progression: Ki-67 and MMP-9. As differentiation of NIBC decreased, we observed increased expression of vimentin, Ki-67, MMP-9, VEGF, CD3+, CD8+, CD68+, p53, CD 34 and decreased expression of E-cadherin, CK20, collagen IV, p63.

We established a relationship between the clinical behavior of NIBC and EMT processes. Thus, stage 1 EMT was characteristic of cancer with recurrence but without progression ($p < 0.05$), and stage 2 EMT was characteristic of NIBC with recurrence and progression ($p < 0.05$). The association of EMT with immune cell infiltration of NIBC was proven. The emergence of EMT in NIBC is associated with an increase in the intensity of infiltration by CD68+ macrophages ($p < 0.01$), CD3+T-lymphocytes ($p < 0.05$), including both CD8+ ($p < 0.01$) and CD4+ ($p < 0.05$) cells.

Conclusions. Non-progressive cancer with recurrence is characterized by stage 1 EMT of the tumor cells ($p < 0.05$), and progressive NIBC with recurrence is characterized by stage 2 EMT ($p < 0.05$). The association of EMT with immune cell infiltration of NIBC was proven. The emergence of EMT in NIBC is associated with an increase in the intensity of infiltration by CD68+ macrophages ($p < 0.01$), CD3+ T-lymphocytes ($p < 0.05$), including both CD8+ ($p < 0.01$) and CD4+ ($p < 0.05$) cells.

For citation:

Tytov YeV, Yakovtsova II, Ivakhno IV, Nehoduiko VV, Makarov VV., Panasenko S.I. Prognostic value of a panel of immunohistochemical markers for determining the risk of recurrence and progression of non-invasive bladder cancer. *Ukrainian journal of radiology and oncology*. 2023;31(4):285–302. DOI: <https://doi.org/10.46879/ukroj.4.2023.285-302>

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами і темами

Стаття є фрагментом планової науково-дослідної роботи кафедри патологічної анатомії Харківської медичної академії післядипломної освіти: «Патогістологічна та імуногістохімічна діагностика і прогноз злоякісних пухлин різної локалізації з урахуванням їх біологічних властивостей та клінічного перебігу», номер державної реєстрації: 0117U000594, прикладна, термін виконання: 2016–2020 рр., керівник – завідувачка кафедри патологічної анатомії та судово-медичної експертизи Харківського національного медичного університету, доктор медичних наук, професор І.І. Яковцова.

Relationship with academic programs, plans and themes

The article is a fragment of the planned research work of the Department of Pathological Anatomy of Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education: «Pathohistological and immunohistochemical diagnosis and prognosis of malignant tumors of various localization, taking into account their biological properties and clinical course», state registration number: 0117U000594, applied, period for performance: 2016–2020, led by Head of the Department of Pathological Anatomy and Forensic Examination of Kharkiv National Medical University, Doctor of Medical Sciences, Professor I.I. Yakovtsova.

ВСТУП

Рак сечового міхура є найпоширенішою патологією у структурі онкологічних захворювань сечового міхура [34]. При гістологічному дослідженні уротеліальний рак виявляють у 90% випадків [27].

Для діагностики та прогнозу клінічного перебігу неінвазивного уротеліального раку сечового міхура (НУРСМ) існує велика кількість алгоритмів, заснованих як на клінічних та морфологічних ознаках [5], так і на даних імуногістохімії (ІГХ) з використанням великої кількості маркерів, зокрема p53, Ki-67, VEGF, E-кадгерин, MMP, bcl та ін [3, 4, 6, 19, 31]. Одним із прогностичних критеріїв раку різних органів є епітеліально-мезенхімальна трансформація (EMT) [33].

При EMT епітеліальний фенотип пухлинних клітин знижується, аж до повного зникнення, за рахунок маркерів мезенхімального фенотипу. Ці зміни призводять до підвищення агресивності біологічної поведінки пухлини та різного перебігу захворювання [8, 9].

Іншим важливим фактором, що впливає на прогноз, є імунна відповідь організму на антигенну стимуляцію пухлини, хоча роль імунокомпетентних клітин (ІКК) у рецидивах та пухлинній прогресії до кінця не вивчена. Неоднорідність групи ІКК призводить до різних прогностичних ефектів і залежить від кількості та якісного складу інфільтрату [25, 36, 37].

Комплексна оцінка прогностичного значення основних маркерів ІГХ, впливу процесів EMT та імунної відповіді на ризик рецидиву та пухлинної прогресії становить науковий та практичний інтерес.

Мета роботи – вивчити прогностичне значення панелі маркерів ІГХ для визначення ризику рецидиву, прогресування НУРСМ, а також впливу процесів EMT та імунної відповіді на результат захворювання.

INTRODUCTION

Bladder cancer is the most widespread pathology in the structure of oncological diseases of bladder [34]. Urothelial cancer is found in 90% of cases during histological analysis [27].

There is a huge number of algorithms for the diagnosis and prognosis of the clinical course of non-invasive bladder cancer (NIBC). They are based on both clinical and morphological features [5] and data from immunohistochemical (IHC) studies in which a large number of markers, including p53, Ki-67, VEGF, E-cadherin, MMP, bcl, etc., were used [3, 4, 6, 19, 31]. One of the prognostic criteria for cancers of various organs is epithelial-mesenchymal transformation (EMT) [33].

During EMT processes, epithelial phenotype of tumor cells decreases and may completely disappear due to markers of mesenchymal phenotype. These changes lead to enhanced aggressiveness of the biological behavior of the tumor and to different course of the disease [8, 9].

Another important factor that has an impact on the prognosis is body's immune response to tumor antigenic stimulation. However, the role of immune competent cells (ICC) in the recurrences and tumor progression is not fully understood. The heterogeneity of the ICC group leads to different prognostic effects and depends on quantitative and qualitative composition of infiltrate [25, 36, 37].

Of scientific and practical interest is a comprehensive assessment of the prognostic value of the main IHC markers, the impact of EMT processes and the immune response on the risk of recurrence and tumor progression.

The objective of this work is to study the prognostic value of the panel of IHC markers for determining the risk of recurrence, progression of NIBC, and also impact of EMT processes and the immune response on the outcome of the disease.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Матеріал був представлений хірургічно видаленими уротеліальними раками сечового міхура ступеня інвазії T1 (проростання пухлини у підслизовий шар

MATERIALS AND METHODS

We studied surgically removed stage T1 malignant bladder tumors that spread to the submucosal tissue without invasion into the muscle tissue in 42 patients

без інвазії у м'язовий) у 42 хворих (рис. 1). Під рецидивом передбачалося виникнення пухлини протягом 5 років після оперативного лікування. Термін «прогресія» означав проростання пухлини в м'язовий шар, тобто перехід пухлини з м'язово-неінвазивного в м'язово-інвазивний, що має велике прогностичне значення для даного виду раку.

(Fig. 1). Recurrence was understood as tumor development within 5 years after surgical treatment. The term «progression» meant the growth of the tumor in the muscle tissue, in other words, transformation of the tumor from non-muscle-invasive to muscle-invasive, which is of great prognostic significance for this type of cancer.

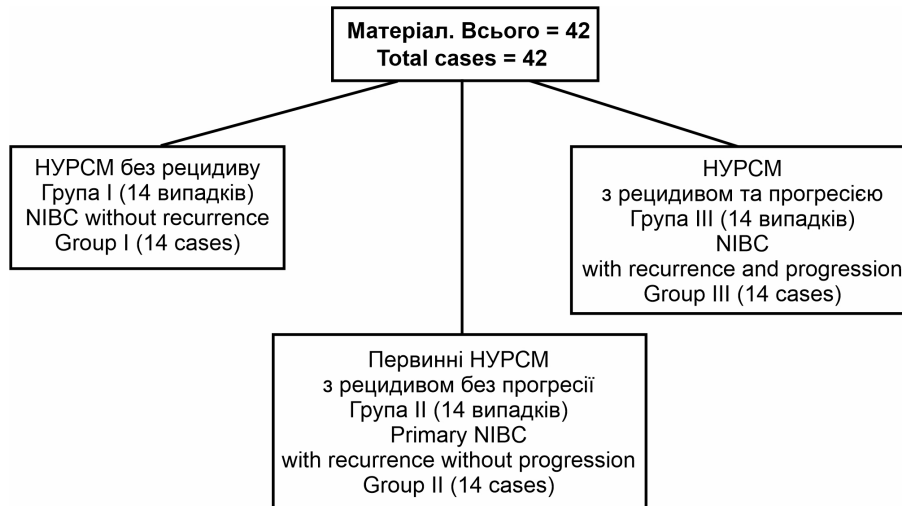


Рис. 1. Розподіл матеріалу на групи. Прогресування розглядалося як інвазія в м'язовий шар стінки сечового міхура
Fig. 1. The division of cases into groups. Progression was considered as invasion into the muscle layer of urinary bladder wall

Враховувалося також диференціювання раків за останньою класифікацією ВООЗ [27]. НУРСМ низького ступеня виявлено у 24 (57,1%) випадках, НУРСМ високого ступеня – у 18 (42,9%).

Для того, щоб виключити вплив фактора диференціювання пухлини на результати дослідження, у кожній з досліджуваних груп була взята рівна кількість випадків НУРСМ високого та низького ступеня.

Таким чином, з 14 випадків НУРСМ у I групі було 8 випадків НУРСМ низького ступеня злоякісності та 6 випадків НУРСМ високого ступеня злоякісності, у II та III групах відповідно також 8 випадків НУРСМ низького ступеня злоякісності та 6 випадків НУРСМ високого ступеня злоякісності.

Дослідження ІГХ проводили з використанням первинних моноклональних антитіл (МСАТ) виробництва ДАКО (Данія), готових до використання до p53, p63, Ki67, E-кадгерину, N-кадгерину, CK7, CK20, віментину (VimentinV9), MMP-9, TGF- β 1, VEGF, CD34+, CD3+, CD4+, CD8+, CD20+, CD68+, колагену IV.

Для оцінки вираженості муногістохімічних маркерів використовували напівкількісну шкалу: 0 – негативна, 1 – слабка, 2 – помірна, 3 – сильна реакція з підрахунком відсотка клітин, що експресують специфічний маркер пухлини.

Показники експресії маркерів, пов'язаних з імунною відповіддю, вивчали в трьох полях зору гістологічних препаратів з найбільш сильною інфільтрацією зі збільшенням $\times 400$. Слабкою (1+) інфільтрацією вважали інфільтрацію від 1 до 50 клітин $\times 400$, помірною (2+) інфільтрацією вважали інфільтрацію від 51 до 100 клітин та сильною (3+) – понад 100 клітин $\times 400$. Маркер CD34+ використовували для розрахунку щільності мікросудин (ЩМС). Підрахунок ЩМС (судинних гарячих точок) виконували у вибраних п'яти ділянках з високою щільністю при збільшенні 400, і середню щільність п'яти ділянок реєстрували як

The differentiation of cancers according to the latest WHO classification was also taken into account [27]. Low-grade NIBC was detected in 24 (57.1%) cases, and high-grade NIBC was detected in 18 (42.9%) cases.

We equaled the number of cases of high and low-grade NIBC in each of the study groups to exclude influence of tumor differentiation factor on the results of the study.

Thus, there were 8 low-grade NIBC and 6 high-grade NIBC cases out from 14 NIBC cases in group I. In groups II and III, there were also 8 low-grade NIBC cases and 6 high-grade NIBC cases in each of the groups.

IHC study was performed using primary ready-to-use monoclonal antibodies produced by DAKO (Denmark) for p53, p63, Ki67, E-cadherin, N-cadherin, CK7, CK20, Vimentin (VimentinV9), MMP-9, TGF- β 1, VEGF, CD34+, CD3+, CD4+, CD8+, CD20+, CD68+, collagen IV.

We used a semi-quantitative scale to assess expression of immunohistochemical markers: 0 – negative, 1 – weak, 2 – moderate, 3 – strong reaction. We also counted the percentage of cells that expressed specific marker in the tumor.

The expression indicators of markers associated with the immune response were studied in 3 microscope view fields of histological slides with the strongest infiltration at $\times 400$ magnification. Weak (1+) infiltration was considered infiltration from 1 to 50 cells $\times 400$, moderate (2+) – from 51 to 100 cells, and strong infiltration (3+) – more than 100 cells $\times 400$. CD34+ marker was used to calculate microvessel density (MVD). Calculation of MVD (vascular hot-spots) was performed in five selected high-density sites at $\times 400$ magnification, and average density of five sites was recorded as MVD level for that tissue. MVD with numbers from 0 to 25 was considered low, from 26 to 50 – moderate, over 51 – high.

Epithelial markers (E-cadherin, cytokeratins 20 (CK20) and 7 (CK7)) and mesenchymal markers (N-cadherin and vimentin) were used to study EMT processes.

рівень ЩМС для цієї тканини. ЩМС із цифрами від 0 до 25 вважалася низькою від 26 до 50 – середньою, понад 51 – високою.

Для вивчення процесів EMT використовували епітеліальні маркери (Е-кадгерин, цитокератини 20 (СК20) та 7 (СК7) та мезенхімальні маркери (N-кадгерин і віментин).

За ступенем EMT НУРСМ розділяли на 6 стадій: 0 – раки без EMT (які не експресують мезенхімальні маркери); 1 – раки з ознаками EMT, переважно епітеліального фенотипу (експресія епітеліальних маркерів переважає над експресією мезенхімальних маркерів, $p < 0,05$); 2 – раки з проміжним епітеліальним фенотипом (експресія епітеліальних маркерів переважає над експресією мезенхімальних маркерів, $p > 0,05$); 3 – раки з проміжним мезенхімальним фенотипом; 4 – раки з переважно мезенхімальним фенотипом; 5 – раки з мезенхімальним фенотипом.

Статистичну обробку результатів дослідження проводили за допомогою пакета Statistica 6.0. Взаємозв'язок між ознаками оцінювали за допомогою непараметричного критерію χ -квадрат Пірсона та критерію Спірмена. Значення $p < 0,05$ вважалося статистично значущим.

According to EMT degree, NIBC were divided into 6 stages: 0 – cancers without EMT (no expression of the mesenchymal markers); 1 – cancers with signs of EMT, predominantly epithelial phenotype (expression of the epithelial markers prevails over expression of the mesenchymal markers, $p < 0.05$); 2 – cancers with intermediate epithelial phenotype (expression of the epithelial markers prevails over expression of the mesenchymal markers, $p > 0.05$); 3 – cancers with intermediate mesenchymal phenotype; 4 – cancers with a predominantly mesenchymal phenotype; 5 – cancers with mesenchymal phenotype.

Statistical processing of the research results was performed using the Statistica 6.0 package. The relationship between features was evaluated by the non-parametric Pearson Chi-square test and Spearman test. A $p < 0.05$ value was considered statistically significant.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

RESULTS AND DISCUSSION

У випадку НУРСМ експресія Ki-67 була варіабельною, в середньому $30,71\% \pm 5,11\%$, і залежала від належності пухлини до груп, що досліджуються (табл. 1).

In NIBC, Ki-67 expression was variable and averaged $30.71\% \pm 5.11\%$, depending on tumor belonging to the study groups (Table 1).

Таблиця 1. Зв'язок між рівнем експресії колагену IV типу, MMP-9, Ki-67 і НУРСМ, що належать до груп дослідження
Table 1. Relationship between level of expression of type IV collagen, MMP-9, Ki-67 and NIBC in the study groups

Експресія маркерів Expression of markers		Група I / Group I n = 14	Група II / Group II n = 14	Група III / Group III n = 14	Критерій χ^2 Chi-squared test
Колаген IV типу Type IV collagen	0	6 (42,9%)	8 (57,1%)	10 (71,4%)	$\chi^2 = 2,33$ $p = 0,31$ ($\chi^2_{crit} = 5,99$)
	1+	8 (57,1%)	6 (42,9%)	4 (28,6%)	
	2+	0	0	0	
Ki-67	0	0	0	0	$\chi^2 = 10,31$ $p < 0,05$ ($\chi^2_{crit} = 9,48$)
	1+	10 (71,4%)	5 (35,7%)	2(14,3%)	
	2+	4 (28,6%)	8 (57,1%)	10(71,4%)	
	3+	0	1 (7,2%)	2(14,3%)	
MMP-9	0	0	0	0	$\chi^2 = 10,31$ $p < 0,05$ ($\chi^2_{crit} = 9,48$)
	1+	9 (64,3%)	4 (28,6%)	1 (7,1%)	
	2+	4 (28,6%)	4 (28,6%)	4 (28,6%)	
	3+	1 (7,1%)	6 (42,8%)	9 (64,3%)	

Відмінності у експресії MMP-9 також мали статистично значущий характер. Виявлено, що НУРСМ високого ступеня злоскісності були пов'язані з індексом проліферації (ІП) Ki-67 $> 20\%$ ($p < 0,05$), сильною експресією MMP-9 ($p < 0,05$) та відсутністю колагену IV типу ($p < 0,01$) (рис. 2, 3).

Слабка експресія MMP-9 та ІП Ki-67 $< 20\%$ були пов'язані з НУРСМ II групи ($p < 0,05$ та $p < 0,01$ відповідно); ІП Ki-67 $> 50\%$ – з НУРСМ III групи ($p < 0,05$). Нами виявлена кореляція між експресією маркерів Ki-67 та MMP-9 ($r=0,78$, $p<0,01$) та зворотна залежність між Ki-67 та колагеном IV типу ($r = -0,80$, $p<0,01$), MMP-9 та колагеном IV типу ($r = -0,86$, $p < 0,01$).

Апоптоз та регуляцію клітинного циклу при НУРСМ оцінювали за допомогою маркерів p53 та p63. Середня експресія p53 становила $0,93 \pm 0,15$. У I групі здебільшого (64,3%) маркер не експресувався,

Differences in MMP-9 expression were also statistically significant. It was found that high-grade NIBC were associated with Ki-67 proliferation index $> 20\%$ ($p < 0.05$), strong expression of MMP-9 ($p < 0.05$), and absence of type IV collagen ($p < 0.01$) (Fig. 2, 3).

Weak expression of MMP-9 and Ki-67 proliferation index $< 20\%$ were associated with NIBC of group II ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively), Ki-67 proliferation index $> 50\%$ – with NIBC of group III ($p < 0.05$). We found a correlation between expression of Ki-67 and MMP-9 ($r = 0.78$, $p < 0.01$), and inverse relationship between Ki-67 and type IV collagen ($r = -0.80$, $p < 0.01$), MMP-9 and type IV collagen ($r = -0.86$, $p < 0.01$).

Apoptosis and regulation of the cell cycle in NIBC were assessed using p53 and p63. The average expression of p53 was 0.93 ± 0.15 . In group I, there was no expression of the marker in most cases (64.3%).

у II групі у 50% випадків спостерігалася слабка експресія, у III групі 57,2% пухлин були з помірною експресією, відмінності мали статистично значущий характер ($p < 0,05$). Виявлено сильніший зв'язок між рівнем експресії p53 та ступенем диференціювання пухлини ($p < 0,01$).

In group II, 50% of cases showed weak expression, and in group III, 57.2% of tumors were with moderate expression, differences were significant ($p < 0.05$). A stronger relationship was found between the level of p53 expression and the degree of tumor differentiation ($p < 0.01$).

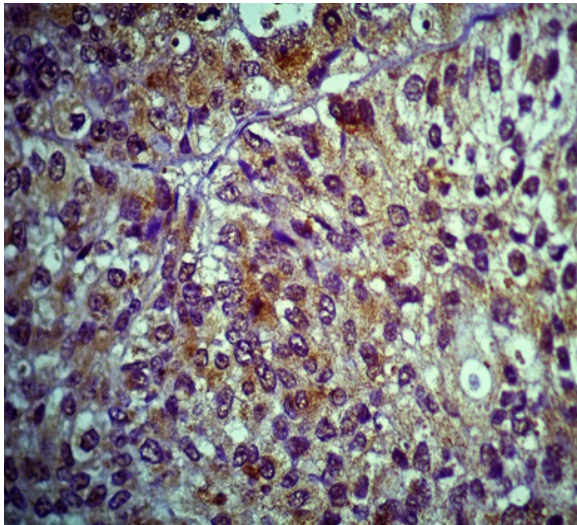


Рис. 2. Експресія MMP-9+++
Fig. 2. Expression of MMP-9+++

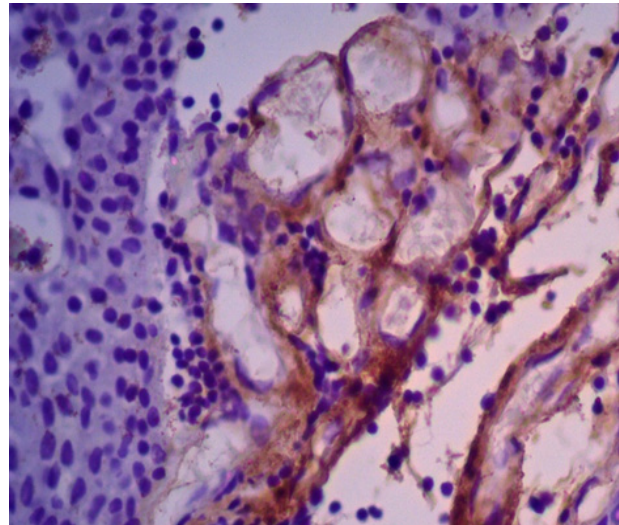


Рис. 3. Відсутність експресії колагену в базальній мембрані епітеліального шару. Колаген IV типу експресується тільки в стінках кровоносних судин
Fig. 3. Absence of collagen expression in the basement membrane of the epithelial layer. Collagen type IV is expressed only in the walls of blood vessels

Ми спостерігали зв'язок між рівнем експресії p63 та p53 ($r = -0,371$, $p = 0,5$). Експресія p63 переважно спостерігалася в ядрах базальних клітин пухлинного епітеліального шару; достовірних відмінностей у групах виявлено не було. Однак негативна експресія цього маркера була характерною для пухлин з високим ступенем злоякісності ($p < 0,01$).

We observed a relationship between the level of p63 and p53 expression ($r = -0.371$, $p = 0.5$). Expression of p63 was predominantly observed in nuclei of basal cells of tumor epithelial layer; no significant differences were found in the groups. However, negative expression of this marker was typical for tumors with a high degree of malignancy ($p < 0.01$).

Вивчення VEGF та оцінка ЩМС з використанням CD34 (як маркера пухлинного неангіогенезу) не встановили їхнього прогностичного значення для НУРСМ (табл. 2). Однак зниження диференціювання НУРСМ супроводжувалося посиленням неангіогенезу як за рахунок збільшення ЩМС ($p < 0,01$), так і рівня експресії VEGF ($p < 0,05$). Також було виявлено пряму кореляцію між експресією VEGF і ЩМС ($r = 0,677$, $p < 0,05$) (табл. 2).

The study of VEGF and assessment of MVD, using CD34 (as marker of tumor neoangiogenesis) did not establish their predictive value for NIBC (Table 2). However, a decrease in NIBC differentiation was accompanied by neoangiogenesis increase due to increase in both MVD ($p < 0.01$) and level of VEGF expression ($p < 0.05$). A direct correlation was also found between VEGF expression and MVD ($r = 0.677$, $p < 0.05$) (Table 2).

Таблиця 2. Взаємозв'язок між маркерами неангіогенезу та НУРСМ, що належать до груп дослідження
Table 2. Relationship between markers of neoangiogenesis and NIBC in the study groups

Експресія маркерів Expression of markers	Групи / Groups			Критерій χ^2 Chi-squared test
	I, n (%)	II, n (%)	III, n (%)	
ЩМС	8 (57,1%)	4 (28,6%)	4 (28,6%)	$\chi^2=1,07$ $p=0,58$ ($\chi^2_{crit} = 5,99$)
MVD	6 (42,9%)	10 (71,4%)	10 (71,4%)	
VEGF 1+	4 (28,6%)	5 (35,7%)	3 (21,4%)	$\chi^2=0,7$ $p=0,70$ ($\chi^2_{crit} = 5,99$)
2+	10 (71,4%)	11 (64,3%)	11 (78,6%)	

Для вивчення процесів EMT в НУРСМ при ІГХ дослідженнях використовували первинні моноклональні антитіла до E-кадгерину, цитокератинам 20 (CK20) і 7 (CK7), N-кадгерину, виментину і TGF- β 1. Показана залученість досліджуваних маркерів в процес EMT та їх взаємозв'язок (рис. 4). Однак зв'язку між кожним

We used primary monoclonal antibodies to E-cadherin, cytokeratins 20 (CK20) and 7 (CK7), N-cadherin, vimentin, and TGF- β 1 to study EMT processes in NIBC during the IHC study. The involvement of the studied markers in EMT process and their relationship were proven (Fig. 4). However, no relationship was found

із маркерів та їх належністю до досліджуваних груп виявлено не було.

between each of the markers and their belonging to the study groups.

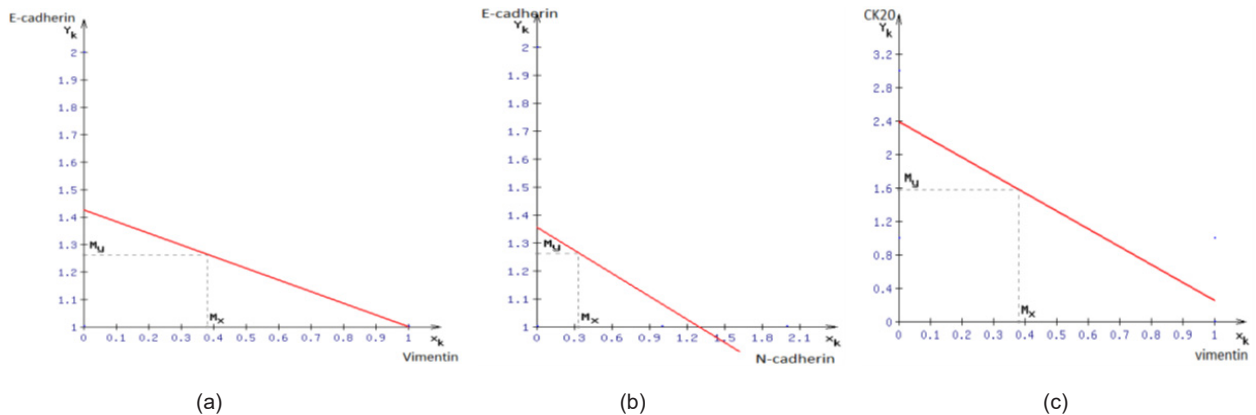


Рис. 4. Взаємозв'язок досліджуваних маркерів:

- (a) зворотна залежність між експресією віментину та Е-кадгерину, $r = -0,46$, $p < 0,01$;
- (b) зворотний зв'язок між експресією Е-кадгерину та N-кадгерину, $r = -0,35$, $p < 0,05$;
- (c) зворотна залежність між віментином і СК 20, $r = -0,80$, $p < 0,01$.

Fig. 4. Involvement of the studied markers:

- (a) inverse relationship between expression of vimentin and E-cadherin, $r = -0.46$, $p < 0.01$;
- (b) inverse relationship between expression of E-cadherin and N-cadherin, $r = -0.35$, $p < 0.05$;
- (c) inverse relationship between vimentin and CK 20, $r = -0.80$, $p < 0.01$.

Ступінь злоякісності (диференціювання) пухлини мав пряму залежність від рівня експресії віментину та зворотну залежність від рівня експресії Е-кадгерину та СК20. Рівні експресії N-кадгерину, СК7 та TGF- β 1 не впливали на ступінь злоякісності пухлини. Однак розподіл випадків НУРСМ за стадіями ЕМТ підтвердив дані про прямий вплив процесів ЕМТ на несприятливий прогноз захворювання.

У більшості випадків 54,7% (23/42) експресії маркерів мезенхімального фенотипу в пухлинних клітинах не спостерігалось, що відповідає 0 стадії ЕМТ.

Експресія віментину або N-кадгерину або коекспресія маркерів з'являлася в 40,4% (17/42) випадків, але експресія епітеліальних маркерів переважала над експресією мезенхімальних маркерів ($p < 0,05$), що визначало належність НУРСМ до стадії 1 ЕМТ.

Стадії 2 ЕМТ відповідали лише 4,9% (2/42) випадків. Вони показали помірну або слабку експресію N-кадгерину, слабку експресію віментину, слабку експресію Е-кадгерину та СК7, тоді як експресія СК20 була негативною.

НУРСМ 3 стадії та вище були відсутні. У досліджуваних групах найбільша частка випадків з ЕМТ 1 стадії належить другій групі – 64,3% (9/14).

Всі випадки з ЕМТ 2-ї стадії були розподілені в 3-тю групу. Таким чином, встановлено достовірний зв'язок між ризиком рецидивів НУРСМ та ЕМТ 1-ї стадії ($p < 0,05$), а також між ризиком розвитку рецидивів при прогресуванні НУРСМ та 2-ю стадією ЕМТ ($p < 0,05$). Нами виявлено взаємозв'язок між ступенем інфільтрації НУРСМ клітинами з фенотипом CD 68+, CD3+, CD8+, CD4+, CD20+, що переважно інфільтрують строму пухлини, та стадією ЕМТ (табл. 3).

Встановлено, що при НУРСМ поява та стадія ЕМТ залежали від рівня інфільтрації ІКК: CD68+ ($\chi^2 = 10,0$, $p < 0,01$), CD3+ ($\chi^2 = 12,9$, $p < 0,05$), CD8+ ($\chi^2 = 18,9$, $p < 0,01$), CD4+ ($\chi^2 = 8,2$, $p < 0,05$).

Виявлено, що ЕМТ, асоційована з CD68+, здебільшого пов'язана зі зниженням експресії цитокератинів та Е-кадгерину.

The degree of tumor malignancy (differentiation) had a direct relationship with level of vimentin expression and an inverse relationship with levels of E-cadherin and CK20 expression. Expression levels of N-cadherin, CK 7, and TGF- β 1 did not affect degree of tumor malignancy. However, distribution of NIBC cases by stages of EMT confirmed the data about direct influence of EMT processes on a poor prognosis of the disease.

In most cases (54.7% (23/42)), expression of mesenchymal phenotype markers in tumor cells was not observed, which corresponded to stage 0 EMT.

Expression of vimentin or N-cadherin or co-expression of markers appeared in 40.4% (17/42) of cases, but expression of epithelial markers prevailed over the expression of mesenchymal markers ($p < 0.05$), which determined that NIBC corresponded to stage 1 EMT.

Stage 2 EMT was detected only in 4.9% (2/42) of cases. They showed moderate or weak expression of N-cadherin, weak expression of vimentin, weak expression of E-cadherin and CK7, while CK20 expression was negative.

Stage 3-3+ NIBC was absent. In the study groups, the largest proportion of cases with stage 1 EMT was in the second group – 64.3% (9/14).

All cases with stage 2 EMT were put in group 3. Thus, a significant relationship was established between the risk of recurrences of NIBC and stage 1 EMT ($p < 0.05$), as well as between the risk of developing recurrences with progression of NIBC and stage 2 EMT ($p < 0.05$). We found relationship between infiltration degree of NIBC by cells with CD68+, CD3+, CD8+, CD4+, CD20+ phenotypes, which mainly infiltrate the tumor stroma, and the EMT stage (Table 3).

It was found that in NIBC, emergence and stage of EMT depended on level of infiltration by ICC: CD68+ ($\chi^2 = 10.0$, $p < 0.01$), CD3+ ($\chi^2 = 12.9$, $p < 0.05$), CD8+ ($\chi^2 = 18.9$, $p < 0.01$), CD4+ ($\chi^2 = 8.2$, $p < 0.05$).

It was revealed that EMT associated with CD68+ was mainly connected with a decrease in cytokeratins and E-cadherin expression.

Таблиця 3. Зв'язок між ступенем інфільтрації імунікомпетентних клітин і стадією EMT
Table 3. Relationship between degree of immune-competent cell infiltration and stage of EMT

Маркери Markers		Стадія EMT / Stage of EMT			Критерій χ^2 Chi-squared test
		0, n = 24	1, n = 16	2, n = 2	
CD68+	1+	13 (54,1%)	2 (12,2%)	2 (100%)	$\chi^2=10,0, p<0,01$
	2+	11 (45,8%)	14 (87,5%)	0	
CD8+	1+	11 (45,8%)	1 (6,1%)	0	$\chi^2=18,9, p<0,01$
	2+	7 (29,2%)	2 (12,2%)	2 (100%)	
	3+	6 (25%)	13 (81,7%)	0	
CD4+	1+	9 (37,5%)	0	1 (50%)	$\chi^2=8,2, p<0,05$
	2+	15 (62,5%)	16 (100%)	1 (50%)	
CD20+	1+	18 (75%)	10 (62,5%)	2 (100%)	$\chi^2=1,5, p=0,45$
	2+	6 (25%)	6 (37,5%)	0	
CD3+	1+	10 (41,6%)	0	0	$\chi^2=12,9, p<0,05$
	2+	8 (33,4%)	7 (43,8%)	2 (100%)	
	3+	6 (25%)	9 (56,2%)	0	

EMT 1-ї стадії, асоційована з вираженою CD3+ інфільтрацією, пов'язана в основному з більш високою експресією віментину ($p < 0,05$) та зниженням експресії CK20 ($p < 0,05$). У той же час слабка інфільтрація CD3+ поєднувалася з помірною експресією E-кадгерину ($p < 0,01$) та відсутністю експресії N-кадгерину ($p < 0,05$). EMT, пов'язана з вираженою CD8+ інфільтрацією, була пов'язана в основному з віментином ($p < 0,01$) та зниженням експресії CK20 ($p < 0,01$). При цьому експресія E-кадгерину знижувалася, а експресія N-кадгерину дещо зростала ($p > 0,05$) зі збільшенням рівня CD8+ інфільтрації пухлин.

EMT 1-ї стадії, асоційована із збільшенням CD4+ інфільтрації, пов'язана переважно з експресією віментину ($p < 0,05$), зниженням експресії CK20 ($p < 0,01$) та E-кадгерину ($p < 0,01$).

Встановлено, що диференціювання, рецидиви та рецидиви при прогресуванні НУРСМ залежать від інфільтрації імунікомпетентних клітин, що може бути критерієм прогнозу захворювання. Так було встановлено, що збільшення інфільтрації CD3+, CD8+ та CD68+ ІКК у стромі пухлини тягне за собою збільшення та ризик рецидивів як без прогресування, так і з прогресуванням ($p < 0,05, p < 0,05, p < 0,05$) і являє собою пряму залежність між ступенем інфільтрації імунікомпетентних клітин та ступенем злоякісності пухлини ($p < 0,01, p < 0,01, p < 0,01$). Ступінь інфільтрації CD4+ та CD20+ лімфоцитів не впливав на прогноз.

Ki-67 є маркером пухлинної проліферативної активності та, за даними деяких авторів, незалежним маркером прогнозу рецидиву та прогресування НУРСМ [2, 20, 38]. Наше дослідження знайшло підтвердження цим даним і виявило асоціацію між експресією Ki-67 та MMP-9, а також зворотну кореляцію між експресією Ki-67 та колагену IV типу та MMP-9 з колагеном IV типу, що свідчить про зв'язок між проліферативною активністю пухлини та її інвазивними властивостями, що здійснюється за рахунок експресії MMP-9 та руйнування позаклітинного матриксу, у тому числі базальної мембрани. Втрата експресії колагену IV типу пов'язана з характером зростання, інвазією та втратою пухлиною здатності утворювати диференційовані структури [7, 12].

Ядерний білок P53, в нормі активує апоптоз в клітині; при генетичних мутаціях може діяти як інгібітор апоптозу, тим самим погіршуючи подальший прогноз [6, 19]. Підвищення експресії цього

Stage 1 EMT associated with severe CD3+ infiltration was primarily connected with higher vimentin expression ($p < 0.05$) and decrease in CK20 expression ($p < 0.05$). At the same time, weak infiltration of CD3+ was connected with moderate expression of E-cadherin ($p < 0.01$) and lack of expression of N-cadherin ($p < 0.05$). EMT associated with severe CD8+ infiltration was mainly connected with vimentin ($p < 0.01$) and decrease in CK20 expression ($p < 0.01$). At the same time, the expression of E-cadherin decreased, while the expression of N-cadherin increased slightly ($p > 0.05$) as the level of CD8+ infiltration of tumors increased.

Stage 1 EMT associated with increase in CD4+ infiltration was primarily connected with vimentin ($p < 0.05$), decrease in CK20 ($p < 0.01$) and E-cadherin ($p < 0.01$) expression.

It was established that differentiation, recurrence, and recurrence with progression of NIBC depended on ICC infiltration, which can serve as a criterion for the disease prognosis. So it was found that an increase in infiltration of CD3+, CD8+ and CD68+ ICC in the tumor stroma entailed increase in the number and risk of recurrences both without and with progression ($p < 0.05, p < 0.05, p < 0.05$), and there was a direct relationship between the degree of ICC infiltration and the degree of tumor malignancy ($p < 0.01, p < 0.01, p < 0.01$). The degree of infiltration of CD4+ and CD20+ lymphocytes did not affect the prognosis.

Ki-67 is a marker of tumor proliferative activity and, according to the data of some authors, an independent marker of recurrence and progression prognosis of NIBC [2, 20, 38]. Our study confirmed these data and revealed an association between Ki-67 and MMP-9 expression, as well as an inverse correlation between the expression of Ki-67 and type IV collagen and MMP-9 with type IV collagen, which indicates an association between proliferative activity of tumor and its invasive properties, which is carried out through expression of MMP-9 and destruction of extracellular matrix, including basal membrane. Loss of type IV collagen expression is associated with the nature of growth, invasion, and loss of tumor ability to form differentiated structures [7, 12].

P53 is a nuclear protein that normally activates apoptosis in a cell; in case of genetic mutations it can act as an inhibitor of apoptosis, thereby worsening further prognosis [6, 19]. An increase in this marker expression

маркера спостерігається у пухлинах високого ступеня злоякісності [33, 40], хоча у деяких роботах цей факт заперечується [22]. P63, у свою чергу, пригнічує трансактивацію p53 і контролює внутрішньоклітинну адгезію при прогресуванні пухлини. Це пояснює взаємозв'язок між рівнем експресії маркера та стадією пухлини, але його прогностичне значення остаточно не визначено, оскільки p63 має кілька ізоформ з протилежними функціями [19]. Деякі автори пов'язують зниження імунореактивності p63 при НУРСМ з несприятливим прогнозом [22, 29], і, на їхню думку, рівень експресії не впливає на ступінь диференціювання пухлини [22]. Інші дослідники наводять контраргументи про зниження експресії p63 в пухлинах з більш високим ступенем за відсутності будь-якого впливу рівня експресії маркера на прогноз [10].

Виявлені особливості експресії p63 та p53 підкреслюють уявлення про те, що p53 є незалежним прогностичним маркером, а роль p63 у прогнозі обмежена.

Ангіогенез, пов'язаний із щільністю мікросудин, відіграє важливу роль у розвитку рецидивів та прогресуванні пухлин, у тому числі НУРСМ [14]. У разі гіпоксії на неангіогенез впливає активація ангіогенних чинників зростання, зокрема чинника зростання ендотелію судин (VEGF) [35]. Крім ЩМС як незалежного прогностичного критерію, збільшення ЩМС у стромі пухлини пов'язане з прогресуванням стадії та зниженням диференціювання НУРСМ [15, 39]. Одні автори пов'язують високий рівень експресії VEGF із ризиком рецидиву та прогресування пухлини [37, 39], інші спростовують цей зв'язок [1, 31].

Наше дослідження підтвердило роль VEGF у неангіогенезі НУРСМ, що визначається прямою кореляцією між рівнем експресії VEGF та ЩМС ($r = 0,677$, $p < 0,05$). Однак ці маркери мають обмежене прогностичне значення.

При ЕМТ у клітинах епітеліального шару пухлини знижується вираженість епітеліального фенотипу та збільшується мезенхімальний фенотип, що призводить до підвищення агресивних властивостей пухлини [9, 16]. У результаті цієї трансформації НУРСМ однієї стадії та диференціювання мають різний клінічний перебіг, характеризуються посиленням інвазивних властивостей, збільшенням частоти рецидивів та прогресування [17, 26, 28].

У нашій роботі жоден з 6 вивчених маркерів ЕМП не мав самостійного прогностичного значення, проте при врахуванні коекспресії досліджуваних маркерів та оцінці пухлин за стадіями ЕМП прогностичне значення цих маркерів та відповідний розподіл пухлин було доведено.

У цій роботі також показано прогностичне значення інфільтрації пухлини CD3+, CD8+, CD68+ клітинами та їх роль у формуванні агресивної біологічної поведінки через ЕМТ.

Результати підтверджують, що імунна система відіграє важливу роль у прогнозі НУРСМ, хоч вона залишається не до кінця вивченою. З одного боку, CD8+-лімфоцити повинні безпосередньо атакувати чужорідні пухлинні клітини, з іншого боку, хронічне запалення (місцева імунна відповідь) може бути фактором, що ініціює виникнення НУРСМ, подальшого рецидиву та пухлинної прогресії [13].

Наявність запальної інфільтрації, з одного боку, трактується як поганий прогностичний ознаку [37], а з іншого – відзначають її захисний характер та сприятливий прогностичний ефект [36].

is observed in high-grade tumors [33, 40], although some works deny this fact [22]. P63, in its turn, inhibits p53 transactivation and controls intracellular adhesion during tumor progression. This explains the relationship between the level of marker expression and the stage of tumor, but its prognostic value is not fully determined since p63 has several isoforms with opposite functions [19]. Some authors associate a decrease in p63 immunoreactivity in NIBC with a poor prognosis [22, 29], and, in their opinion, expression level does not affect the degree of tumor differentiation [22]. Other researchers cite counterarguments about a decrease in p63 expression in tumors with a higher grade of malignancy while any effect of the marker expression level on prognosis is absent [10].

The revealed features of p63 and p53 expression emphasize the idea that p53 is an independent prognostic marker, and the role of p63 in prognosis is limited.

Angiogenesis, which is connected with MVD, plays an important role in the development of recurrence and progression of tumors, including NIBC [14]. Under hypoxic conditions, neoangiogenesis is affected by the activation of angiogenic growth factors, including vascular endothelial growth factor (VEGF) [35]. Apart from MVD as an independent prognostic criterion, an increase in MVD in the tumor stroma is associated with the progression of the stage and decreased differentiation of NIBC [15, 39]. Some authors associate a high level of VEGF expression with the risk of tumor recurrence and progression [37, 39], others refute this relationship [1, 31].

Our study confirmed the role of VEGF in the neoangiogenesis of NIBC, which is determined by a direct correlation between level of VEGF expression and MVD ($r = 0.677$, $p < 0.05$). However, these markers have limited prognostic value.

With EMT in tumor epithelial layer cells, severity of the epithelial phenotype decreases, and the mesenchymal phenotype increases, thus leading to the enhancement of aggressive properties of the tumor [9, 16]. As a result of this transformation, NIBC of the same stage and differentiation have a different clinical course, are characterized by enhanced invasive properties, increase in frequency of recurrences and progression [17, 26, 28].

In our work, none of 6 studied EMT markers had an independent prognostic value. However, when taking into account co-expression of the studied markers and the assessment of tumors according to EMT stages, the prognostic value of these markers and the corresponding distribution of tumors was proved.

This work also shows the prognostic value of tumor infiltration by CD3+, CD8+, CD68+ cells and their role in formation of aggressive biological behavior through EMT processes.

The results confirm that immune system plays an important role in the prognosis of NIBC, although it remains not fully understood. On the one hand, CD8+ lymphocytes should directly attack foreign tumor cells, on the other hand, chronic inflammation (local immune response) can be an initiating factor for the onset of NIBC, further recurrence, and tumor progression [13].

The presence of inflammatory infiltration is interpreted as a poor prognostic sign [37] on the one hand, and, on the other hand, scientists note its protective nature and a favorable prognostic effect [36].

Існує багато суперечливих даних. Так, низький рівень експресії CD3+ та CD8+-лімфоцитів при НУРСМ ступеня інвазії Та-Т1 інтерпретується як сприятливий прогностичний критерій, а підвищення рівня експресії пов'язане з прогресуванням стадії та підвищенням ступеня злоякісності пухлини [23]. Інші автори стверджують, що на ступені інвазії Т3-Т4 посилення CD3+-інфільтрації пов'язане зі сприятливим результатом, а зниження виживання пов'язане зі збільшенням кількості CD68+-макрофагів в інфільтраті [32, 36]. Також несприятливим критерієм вважають збільшення відсоткового вмісту CD8-лімфоцитів серед CD3-лімфоцитів, відзначаючи відсутність впливу експресії CD4-T-лімфоцитів на прогноз [11, 23]. Існує й інша думка, згідно з якою зниження пухлинної інфільтрації імункомпетентних клітин (CD4+, CD8+ та CD20+) характерне для пізніших ступенів інвазії Т3-рТ4 [18]. CD20+-В-лімфоцити (маркери хронічного запалення) можуть виступати тригером онкогенезу, але ступінь їх інфільтрації, як і відсоток Т-лімфоцитарної інфільтрації, не корелює зі ступенем злоякісності пухлини [32], хоча утворення фолікулів з В-лімфоцитів деякі автори пов'язують з агресивною біологічною поведінкою пухлини [21].

За деякими даними, існує зв'язок між ЕМТ та запальними та імунними реакціями. Сімейство факторів транскрипції Snail (Snail 1, 2, 3) може індукувати експресію медіаторів запалення – інтерлейкінів. Інтерлейкіни у поєднанні з TGF- β 1, у свою чергу, стимулюють ЕМТ в пухлинних клітинах, створюючи регуляторну петлю, яка посилює взаємозв'язок між ЕМТ та запальними та імунними реакціями [23, 30].

There is a lot of conflicting data. Thus, a low level of expression of CD3+ and CD8+ lymphocytes in Ta-T1 stage NIBC is interpreted as a favorable prognostic criterion, and an increase in the level of expression is associated with progression and advanced stages of malignancy of the tumor [23]. Other authors argue that in cases of T3-T4 stage, increased CD3+ infiltration is associated with a favorable outcome, and a decrease in survival rate is associated with an increase in number of CD68+ macrophages in the infiltrate [32, 36]. Also, an increase in the percentage of CD8+ lymphocytes among CD3+ lymphocytes is considered as unfavorable criterion, and lack of influence of CD4 T-lymphocytes expression on the prognosis should be noted [11, 23]. There is another opinion, according to which a decrease in tumor infiltration of ICC (CD4+, CD8+ and CD20+) is characteristic of later stages of invasion (T3-pT4) [18]. CD20+ B-lymphocytes (markers of chronic inflammation) can act as a trigger for oncogenesis, but the degree of their infiltration, as well as the percentage of T-lymphocytic infiltration, does not correlate with the degree of tumor malignancy [32], although some authors associate the formation of follicles from B-lymphocytes with aggressive biological behavior of the tumor [21].

According to some reports, there is a relationship between EMT and inflammatory and immune responses. The Snail family of transcription factors (Snail 1, 2, 3) can induce the expression of inflammatory mediators – interleukins. Interleukins in collaboration with TGF- β 1, in their turn, stimulate EMT in tumor cells, creating a regulatory loop that enhances the relationship between EMT and inflammatory and immune responses [23, 30].

ВИСНОВКИ

Виявлено, що з 18 досліджених ІГХ маркерів незалежне прогностичне значення рецидиву НУРСМ мають: p53, CD3+, CD8+, CD68+; рецидиву НУРСМ із прогресуванням: Ki-67 та MMP-9.

У міру зниження диференціювання НУРСМ збільшується експресія виментину, Ki-67, MMP-9, VEGF, CD3+, CD8+, CD68+, p53, CD 34; знижується експресія E-кадгерину, CK20, колагену IV, p63.

Встановлено взаємозв'язок між клінічною поведінкою НУРСМ та процесами ЕМТ. Так, для раку з рецидивом без прогресування характерна ЕМТ 1-ої стадії пухлинних клітин ($p < 0,05$), а для НУРСМ з рецидивом та прогресуванням – ЕМТ 2-ої стадії ($p < 0,05$).

Доведено асоціацію ЕМТ з імуноклітинною інфільтрацією НУРСМ. Поява ЕМТ при НУРСМ асоційована з наростанням вираженості інфільтрації CD68+-макрофагами ($p < 0,01$), CD3+Т-лімфоцитами ($p < 0,05$), у тому числі як CD8+ ($p < 0,01$), так і CD4+ ($p < 0,05$) клітинами.

CONCLUSIONS

It was revealed that out of 18 studied IHC markers, only some of them have independent prognostic value for recurrence of NIBC: p53, CD3+, CD8+, CD68+; for recurrence of NIBC with progression: Ki-67 and MMP-9.

As the differentiation of NIBC decreased, an increase in expression of vimentin, Ki-67, MMP-9, VEGF, CD3+, CD8+, CD68+, p53, CD 34, and a decrease in expression of E-cadherin, CK20, collagen IV, p63 were observed.

Relationship between clinical behavior of NIBC and EMT processes was established. Thus, non-progressive cancer with recurrence is characterized by stage 1 EMT of the tumor cells ($p < 0.05$), and progressive NIBC with recurrence is characterized by stage 2 EMT ($p < 0.05$).

The association of EMT with immune cell infiltration of NIBC was proven. The emergence of EMT in NIBC is associated with an increase in the intensity of infiltration by CD68+-macrophages ($p < 0.01$), CD3+ T-lymphocytes ($p < 0.05$), including both CD8+ ($p < 0.01$) and CD4+ ($p < 0.05$) cells.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- Adelmann T., Ioiart I., Ceausu R. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor does not correlate with microvessel density in invasive bladder carcinoma. *Research and Clinical Medicin.* 2018. Vol. 2, № 1. P. 12–17.
- Ahn C., Jeong C.W., Kwak C. Ki-67 as a Prognostic Marker in Upper Urinary Tract Urothelial Carcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clinical Genitourinary Cancer.* 2018. Vol. 16, № 4. P. 1–9.

REFERENCES

- Adelmann T, Ioiart I, Ceausu R. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor does not correlate with microvessel density in invasive bladder carcinoma. *Research and Clinical Medicin.* 2018;2(1):12–7. (In English).
- Ahn C, Jeong CW, Kwak C. Ki-67 as a Prognostic Marker in Upper Urinary Tract Urothelial Carcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clinical Genitourinary Cancer.* 2018;16(4):1–9. (In English).

- Ali H., Ibraheem M.H., Alhindawi M.M. Immunohistochemical expression of matrix metalloproteinase-9 in urothelial carcinoma of urinary bladder. *Medical Journal*. 2018. Vol. 24, № 3. P. 109–114.
- Balci M.G., Tayfur M. Loss of E-cadherin expression in recurrent non-invasive urothelial carcinoma of the bladder. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2018. Vol. 11, № 8. P. 4163–4168.
- Blazeby J.M., Hall E., Aaronson N.K., Lloyd L., Waters W., Kelly J.D., Fayers P. Validation and Reliability Testing of the EORTC QLQ-NMIBC24 Questionnaire Module to Assess Patient-Reported Outcomes in Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer. *European urology*. 2014. Vol. 66(6). P. 1148–1156. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2014.02.034>
- Bodoora K., Al-Ghabkarib A., Matakac I. et al. Assessment of p53 mutations, expression and prognosis in bladder cancer patients from Jordan: Identification of novel deletion mutations in the DNA-binding domain. *Meta Gene*. 2017. Vol. 12. P. 33–42. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mgene.2017.01.002>
- Brunner A., Tzankov A. The role of structural extracellular matrix proteins in urothelial bladder cancer (review). *Biomarker Insights*. 2007. № 2. 418 p.
- Calon A., Tauriello D.V., Battle E. TGF-beta in CAF-mediated tumor growth and metastasis. *Seminars in cancer biology*. 2014. №15. 22 p. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2013.12.008>
- Chang S.S., Boorjian S. A., Chou R. et al. Diagnosis and Treatment of Non-Muscle Invasive Bladder Cancer: AUA/SUO Guideline. *The Journal of urology*. 2016. Vol. 196, № 4. P. 1021–1029.
- Charfia S., Khabira A., Mnif H. et al. Immunohistochemical expression of HER2 in urothelial bladder carcinoma and its correlation with p53 and p63 expression. *Journal of Microscopy and Ultrastructure*. 2013. Vol. 1, № 1. P. 17–21. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmau.2013.06.001>
- Desgrandchamps F., LeMaout J., Goujon A. et al. Prediction of non-muscle-invasive bladder cancer recurrence by measurement of checkpoint HLAG's receptor ILT2 on peripheral CD8+ T cells. *Oncotarget*. 2018. Vol. 9, № 69. P. 33160–33169. DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26036>
- Enache M., Simionescu C., Lascu L.C. Ki67 and Bcl-2 immunoprotein expression in primitive urothelial bladder carcinoma. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*. 2012. Vol. 53, № 3. P. 521–525.
- Erdurak K., Dundar P.E., Ozyurt B.C. et al. Smoking, occupation, history of selected diseases and bladder cancer risk in Manisa, Turkey. *European journal of cancer prevention*. 2014. Vol. 23, № 1. P. 58–61. DOI: <https://doi.org/10.1097/CEJ.0b013e3283631dde>
- Fus L.P., Gornica P. Role of angiogenesis in urothelial bladder carcinoma. *Central European journal of urology*. 2016. Vol. 69, № 3. P. 256–263. DOI: <https://doi.org/10.5173/cej.2016.830>
- Guo Y., Guo Y., Zhu T., Zhuang G. et al. Astrocyte elevated gene-1 expression in urothelial bladder carcinoma and its clinical significance. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2016. Vol. 9, № 12. P. 12779–12784.
- Hammam O., Wishahiz M., Khalil H. et al. Expression of cytokeratin 7, 20, 14 in urothelial carcinoma and squamous cell carcinoma of the Egyptian urinary bladder cancer. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*. 2014. Vol. 44, № 3. P. 733–740.
- Hänze J., Henrici M., Hegele A. et al. Epithelial mesen chymal transition status as associated with anti-cancer responses to tyrosine kinase inhibitors in human bladder cancer cells. *BMC Cancer*. 2013. № 13. 589 p.
- Józwicki W., Brożyna A.A., Siekiera J. et al. Changes in Immunogenicity during the Development of Urinary Bladder Cancer: A Preliminary Study. *International journal of molecular sciences*. 2016. № 17. 285 p. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms17030285>
- Kang Z., Li Y., Yu Y. et al. Research progress on bladder cancer molecular genetics. *Journal of cancer research and therapeutics*. 2014. № 10. P. 89–94. DOI: <https://doi.org/10.4103/0973-1482.145792>
- Ko K., Jeong C., Kwak C. et al. Significance of Ki-67 in non-muscle invasive bladder cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2017. Vol. 8, № 59. P. 100614–100630. DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21899>
- Koti M., Shuo Xu A., Yi Mi Ren K. et al. Tertiary Lymphoid Structures Associate with Tumour Stage in Urothelial Bladder Cancer. *Bladder Cancer*. 2017. Vol. 3, № 4. P. 259–267.
- Koyuncuer A. Immunohistochemical expression of p63, p53 in urinary bladder carcinoma. *Indian journal of pathology & microbiology*. 2013. Vol. 56, № 1. P. 10–15. DOI: <https://doi.org/10.4103/0377-4929.116141>
- Krpina K., Babarovic E., Dordevic G. et al. The association between the recurrence of solitary non-muscle invasive bladder cancer and tumor infiltrating lymphocytes. *Croatian medical journal*. 2012. Vol. 53, № 6. P. 598–604.
- Lopez-Novoa J.M., Nieto M.A. Inflammation and EMT: an alliance towards organ fibrosis and cancer progression. *EMBO molecular medicine*. 2009. Vol. 1, № 6–7. P. 303–314.
- Masson-Lecomte A., Rava M., Real F.X. et al. Biomarkers and Bladder Cancer Prognosis: A Systematic Review. *European urology*. 2014. Vol. 66, № 6. P. 1078–1091.
- Ali H, Ibraheem MH, Alhindawi MM. Immunohistochemical expression of matrix metalloproteinase-9 in urothelial carcinoma of urinary bladder. *Medical Journal*. 2018;24(3):109–14. (In English).
- Balci MG, Tayfur M. Loss of E-cadherin expression in recurrent non-invasive urothelial carcinoma of the bladder. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2018;11(8):4163–8. (In English).
- Blazeby JM, Hall E, Aaronson NK, Lloyd L, Waters W, Kelly JD, Fayers P. Validation and Reliability Testing of the EORTC QLQ-NMIBC24 Questionnaire Module to Assess Patient-Reported Outcomes in Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer. *European urology*. 2014;66(6):1148–56. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2014.02.034>
- Bodoora K, Al-Ghabkarib A, Matakac I. et al. Assessment of p53 mutations, expression and prognosis in bladder cancer patients from Jordan: Identification of novel deletion mutations in the DNA-binding domain. *Meta Gene*. 2017;12:33–42. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mgene.2017.01.002>
- Brunner A, Tzankov A. The role of structural extracellular matrix proteins in urothelial bladder cancer (review). *Biomarker Insights*. 2007;2:418. (In English).
- Calon A, Tauriello DV, Battle E. TGF-beta in CAF-mediated tumor growth and metastasis. *Seminars in cancer biology*. 2014;5:22. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2013.12.008>
- Chang SS, Boorjian SA, Chou R. et al. Diagnosis and Treatment of Non-Muscle Invasive Bladder Cancer: AUA/SUO Guideline. *The Journal of urology*. 2016;196(4):1021–9. (In English).
- Charfia S, Khabira A, Mnif H et al. Immunohistochemical expression of HER2 in urothelial bladder carcinoma and its correlation with p53 and p63 expression. *Journal of Microscopy and Ultrastructure*. 2013;1(1):17–21. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmau.2013.06.001>
- Desgrandchamps F, LeMaout J, Goujon A et al. Prediction of non-muscle-invasive bladder cancer recurrence by measurement of checkpoint HLAG's receptor ILT2 on peripheral CD8+ T cells. *Oncotarget*. 2018;9(69):33160–9. (In English). DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26036>
- Enache M., Simionescu C., Lascu L.C. Ki67 and Bcl-2 immunoprotein expression in primitive urothelial bladder carcinoma. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*. 2012. Vol. 53, № 3. P. 521–525. (In English).
- Erdurak K, Dundar PE, Ozyurt BC et al. Smoking, occupation, history of selected diseases and bladder cancer risk in Manisa, Turkey. *European journal of cancer prevention*. 2014;23(1):58–61. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1097/CEJ.0b013e3283631dde>
- Fus LP, Gornica P. Role of angiogenesis in urothelial bladder carcinoma. *Central European journal of urology*. 2016;69(3):256–63. (In English). DOI: <https://doi.org/10.5173/cej.2016.830>
- Guo Y, Guo Y, Zhu T, Zhuang G et al. Astrocyte elevated gene-1 expression in urothelial bladder carcinoma and its clinical significance. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2016;9(12):12779–84. (In English).
- Hammam O, Wishahiz M, Khalil H et al. Expression of cytokeratin 7, 20, 14 in urothelial carcinoma and squamous cell carcinoma of the Egyptian urinary bladder cancer. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*. 2014;44(3):733–40. (In English).
- Hänze J, Henrici M, Hegele A et al. Epithelial mesen chymal transition status as associated with anti-cancer responses to tyrosine kinase inhibitors in human bladder cancer cells. *BMC Cancer*. 2013;13:589. (In English).
- Józwicki W, Brożyna AA, Siekiera J et al. Changes in Immunogenicity during the Development of Urinary Bladder Cancer: A Preliminary Study. *International journal of molecular sciences*. 2016;17:285. (In English). DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms17030285>
- Kang Z, Li Y, Yu Y et al. Research progress on bladder cancer molecular genetics. *Journal of cancer research and therapeutics*. 2014;10:89–94. (In English). DOI: <https://doi.org/10.4103/0973-1482.145792>
- Ko K, Jeong C, Kwak C et al. Significance of Ki-67 in non-muscle invasive bladder cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8(59):100614–30. (In English). DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21899>
- Koti M, Shuo Xu A, Yi Mi Ren K et al. Tertiary Lymphoid Structures Associate with Tumour Stage in Urothelial Bladder Cancer. *Bladder Cancer*. 2017;3(4):259–67. (In English).
- Koyuncuer A. Immunohistochemical expression of p63, p53 in urinary bladder carcinoma. *Indian journal of pathology & microbiology*. 2013;56(1):10–5. (In English). DOI: <https://doi.org/10.4103/0377-4929.116141>
- Krpina E, Babarovic E, Dordevic G et al. The association between the recurrence of solitary non-muscle invasive bladder cancer and tumor infiltrating lymphocytes. *Croatian medical journal*. 2012;53(6):598–604. (In English).
- Lopez-Novoa JM, Nieto MA. Inflammation and EMT: an alliance towards organ fibrosis and cancer progression. *EMBO molecular medicine*. 2009;1(6–7):303–14. (In English).
- Masson-Lecomte A, Rava M, Real FX et al. Biomarkers and Bladder Cancer Prognosis: A Systematic Review. *European urology*. 2014;66(6):1078–91. (In English).

26. Migita T, Ueda A, Ohishi T et al. Epithelial-mesenchymal transition promotes SOX2 and NANOG expression in bladder cancer. *Laboratory Investigation*. 2017. № 97. P. 567–576.
27. Moch H., Humphrey P.A., Ulbright T.M. et al. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. *European Urolog*. 2016. Vol. 70, № 1. P. 106–119. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.02.028>
28. Monteiro-Reis S, Lobo J, Henrique R et al. Epigenetic Mechanisms In fluencing Epithelial to Mesenchymal Transition in Bladder Cancer. *International journal of molecular sciences*. 2019. Vol. 20, № 297. 19 p.
29. Mursi K, Agag A, Hammam O et al. The expression of p63 in bladder cancer vs. chronic bilharzial bladder. *Arab journal of urology*. 2013. Vol. 11, № 1. P. 1062–1112. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aju.2012.12.008>
30. Nieto M.A. Epithelial-Mesenchymal Transitions in development and disease: old views and new perspectives. *The International journal of developmental biology*. 2009. № 53. P. 1541–1547. DOI: <https://doi.org/10.1387/ijdb.072410mn>
31. Özveren B. Vascular Endothelial Growth Factor and Thrombospondin-1 mRNA Expression in Bladder Tumors: Correlation with Histopathology and Prognosis. *Bull Urooncol*. 2019. № 18. P. 18–23.
32. Pichler R., Fritz J., Zavadil C. et al. Tumor-infiltrating immune cell subpopulations influence the oncologic outcome after intravesical Bacillus Calmette-Guérin therapy in bladder cancer. *Oncotarget*. 2016. Vol. 7, № 26. P. 39916–39930. DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9537>
33. Qamar S., Inam Q.A., Ashraf S. et al. Prognostic Value of p53 Expression Intensity in Urothelial Cancers. *Journal of the College of Physicians and Surgeons–Pakistan*. 2017. Vol. 27, № 4. P. 232–236. DOI: <https://doi.org/2596>
34. Schulster M., Bladder Cancer Academy 2019 Selected Summaries. *Reviews in urology*. 2019. Vol. 21(1). P. 23–28.
35. Sitohy B., Nagy J.A., Dvorak H. F. Anti-VEGF/VEGFR therapy for cancer: reassessing the target. *Cancer research*. 2012. Vol. 72, № 8. P. 9–14.
36. Sjobahl G., Lovgren K., Lauss M. et al. Infiltration of CD3 and CD68 cells in bladder cancer is subtype specific and affects the outcome of patients with muscle-invasive tumors. *Urologic oncology*. 2014. Vol. 32, № 6. P. 791–797. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2014.02.007>
37. Sui X., Lei L., Chen L. et al. Inflammatory microenvironment in the initiation and progression of bladder cancer. *Oncotarget*. 2017. Vol. 8, № 54. P. 93279–93294. DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21565>
38. Wu P., Liu S., Zhang W. Low-level Ki-67 expression as an independent predictor of bladder tumour recurrence in patients with primary upper tract urothelial carcinoma after radical nephroureterectomy. *Japanese journal of clinical oncology*. 2015. Vol. 45, № 12. P. 1175–1181.
39. Zhang B., Wu Z., Xie W. et al. The expression of vasohibin-1 and its prognostic significance in bladder cancer. *Experimental and therapeutic medicine*. 2017. Vol. 14, № 4. P. 3477–3484. DOI: <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4969>
40. Zheng L., Zhu Y., Lei L. et al. Significant expression of CHK1 and p53 in bladder urothelial carcinoma as potential therapeutic targets and prognosis. *Oncology letters*. 2018. Vol. 15, № 1. P. 568–574. DOI: <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7344>
26. Migita T, Ueda A, Ohishi T et al. Epithelial-mesenchymal transition promotes SOX2 and NANOG expression in bladder cancer. *Laboratory Investigation*. 2017;97:567–76. (In English).
27. Moch H, Humphrey PA, Ulbright TM et al. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. *European Urolog*. 2016;70(1):106–119. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.02.028>
28. Monteiro-Reis S, Lobo J, Henrique R et al. Epigenetic Mechanisms In fluencing Epithelial to Mesenchymal Transition in Bladder Cancer. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(297):19. (In English).
29. Mursi K, Agag A, Hammam O et al. The expression of p63 in bladder cancer vs. chronic bilharzial bladder. *Arab journal of urology*. 2013;11(1):1062–112. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aju.2012.12.008>
30. Nieto MA. Epithelial-Mesenchymal Transitions in development and disease: old views and new perspectives. *The International journal of developmental biology*. 2009;53:1541–7. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1387/ijdb.072410mn>
31. Özveren B. Vascular Endothelial Growth Factor and Thrombospondin-1 mRNA Expression in Bladder Tumors: Correlation with Histopathology and Prognosis. *Bull Urooncol*. 2019;18:18–23. (In English).
32. Pichler R, Fritz J, Zavadil C et al. Tumor-infiltrating immune cell subpopulations influence the oncologic outcome after intravesical Bacillus Calmette-Guérin therapy in bladder cancer. *Oncotarget*. 2016;7(26):39916–30. (In English). DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9537>
33. Qamar S, Inam QA, Ashraf S et al. Prognostic Value of p53 Expression Intensity in Urothelial Cancers. *Journal of the College of Physicians and Surgeons–Pakistan*. 2017;27(4):232–6. (In English). DOI: <https://doi.org/2596>
34. Schulster M, Bladder Cancer Academy 2019 Selected Summaries. *Reviews in urology*. 2019;21(1):23–8. (In English).
35. Sitohy B, Nagy JA, Dvorak HF. Anti-VEGF/VEGFR therapy for cancer: reassessing the target. *Cancer research*. 2012;72(8):9–14. (In English).
36. Sjobahl G, Lovgren K, Lauss M et al. Infiltration of CD3 and CD68 cells in bladder cancer is subtype specific and affects the outcome of patients with muscle-invasive tumors. *Urologic oncology*. 2014;32(6):791–7. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2014.02.007>
37. Sui X, Lei L, Chen L et al. Inflammatory microenvironment in the initiation and progression of bladder cancer. *Oncotarget*. 2017;8(54):93279–94. (In English). DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21565>
38. Wu P, Liu S, Zhang W. Low-level Ki-67 expression as an independent predictor of bladder tumour recurrence in patients with primary upper tract urothelial carcinoma after radical nephroureterectomy. *Japanese journal of clinical oncology*. 2015;45(12):1175–81. (In English).
39. Zhang B, Wu Z, Xie W et al. The expression of vasohibin-1 and its prognostic significance in bladder cancer. *Experimental and therapeutic medicine*. 2017;14(4):3477–84. (In English). DOI: <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4969>
40. Zheng L, Zhu Y, Lei L et al. Significant expression of CHK1 and p53 in bladder urothelial carcinoma as potential therapeutic targets and prognosis. *Oncology letters*. 2018;15(1):568–74. (In English). DOI: <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7344>

Перспективи подальших досліджень

Prospects for further research

Враховуючи збільшення онкологічної захворюваності кожен рік, виконана робота дозволяє підбирати адекватну терапію в післяопераційному періоді для зниження кількості рецидивів. Імуногістохімічний метод дослідження пухлин сечового міхура дозволяє контролювати ефективність проведеного лікування та перспективний для вдосконалення.

Taking into account the increase in the incidence of cancer every year, our work allows adequate therapy to be selected in the postoperative period to reduce the number of recurrences. The immunohistochemical method of studying bladder tumors makes it possible to monitor the effectiveness of the treatment and is promising for improvement.

Конфлікт інтересів

Conflict of interest

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

The authors state no conflict of interest.

Інформація про фінансування

Funding information

Фінансування видатками Державного бюджету України.

Financed by the state budget of Ukraine

ВІДОМОСТІ ПРО АВТОРІВ

INFORMATION ABOUT AUTHORS

Титов Євген В'ячеславович – кандидат медичних наук, доцент кафедри патологічної анатомії та судово-медичної експертизи Харківського національного медичного університету Міністерства охорони здоров'я України; просп. Науки, буд. 4, Харків, Україна, 61022;

e-mail: titovevgeniy@ukr.net
моб.: +38 (066) 010-24-77

Внесок автора: виконання дослідження, отримання результатів дослідження.

Яковцова Ірина Іванівна – доктор медичних наук, професор, завідувачка кафедри патологічної анатомії та судово-медичної експертизи Харківського національного медичного університету Міністерства охорони здоров'я України; просп. Науки, буд. 4, Харків, Україна, 61022;

e-mail: docpathomorph@gmail.com
моб.: +38 (067) 571-18-11

Внесок автора: формування мети та задач роботи, аналіз отриманих результатів дослідження, формування висновків.

Івахно Ігор Володимирович – кандидат медичних наук, доцент кафедри патологічної анатомії та судово-медичної експертизи Харківського національного медичного університету Міністерства охорони здоров'я України; просп. Науки, буд. 4, Харків, Україна, 61022;

e-mail: igorv.lvakhno@gmail.com
моб.: +38 (095) 665-39-91

Внесок автора: аналіз отриманих даних із застосуванням методів статистики.

Негодуйко Володимир Володимирович – доктор медичних наук, доцент, полковник медичної служби, начальник клініки невідкладної медичної допомоги (та прийому і евакуації) Військово-медичного клінічного центру Північного регіону, доцент кафедри хірургії № 4 Харківського національного медичного університету Міністерства охорони здоров'я України; проспек. Науки, буд. 4, Харків, Україна, 61022;

e-mail: vol-ramzes13@ukr.net
моб.: +38(050)452-32-73

Внесок автора: огляд літератури, написання статті.

Макаров Віталій Володимирович – доктор медичних наук, професор, завідувач кафедри хірургії № 4 Харківського національного медичного університету Міністерства охорони здоров'я України; просп. Науки, буд. 4, Харків, Україна, 61022;

e-mail: docvvmakarov@gmail.com
моб.: +38 (067) 951-83-82

Внесок автора: автор ідеї, формування висновків.

Панасенко Сергій Іванович – доктор медичних наук, професор, майор медичної служби, начальник клініки мобільної польової Військово-медичного клінічного центру Північного регіону, завідувач кафедри хірургії №3 Полтавського державного медичного університету Міністерства охорони здоров'я України; вул. Ватутіна, буд. 9/68, кв. 14, Полтава, Україна, 36039;

e-mail: panssi@ukr.net
моб.: +38 (050) 410-32-38

Внесок автора: автор ідеї, вступ, формування висновків.

Tytov Evgeniy Vyacheslavovich – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Pathological Anatomy and Forensic Medical Examination of the Kharkiv National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine; 4, Nauky Ave., Kharkiv, Ukraine, 61022;

e-mail: titovevgeniy@ukr.net
tel.: +38 (066) 010-24-77

Author's contribution: conducting the study, obtaining the results of the study.

Yakovtsova Iryna Ivanivna – Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Pathological Anatomy and Forensic Medical Examination of the Kharkiv National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine; 4, Nauky Ave., Kharkiv, Ukraine, 61022;

e-mail: docpathomorph@gmail.com
tel.: +38 (067) 571-18-11

Author's contribution: formation of the goal and objectives of the work, analysis of the obtained research results, formation of conclusions.

Ivakhno Ihor Volodymyrovych – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Pathological Anatomy and Forensic Medical Examination of the Kharkiv National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine; 4, Nauky Ave., Kharkiv, Ukraine, 61022;

e-mail: igorv.lvakhno@gmail.com
tel: +38 (095) 665-39-91

Author's contribution: analysis of the obtained data using statistical methods.

Nehoduiko Volodymyr Volodymyrovych – Doctor of Medical Sciences, Associate Professor, Colonel of Medical Service, Head of Emergency Medical Care (including admission and evacuation) Clinic of the Military Medical Clinical Center of the Northern Region Ministry of Defense of Ukraine, Associate Professor of the Department of Surgery №4 of the Kharkiv National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine; 4, Nauky Ave., Kharkiv, Ukraine, 61022;

e-mail: vol-ramzes13@ukr.net
tel.: +38 (050) 452-32-73

Author's contribution: literature review, article writing.

Makarov Vitaliy Volodymyrovych – Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Surgery №4 of the Kharkiv National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine; 4, Nauky Ave., Kharkiv, Ukraine, 61022;

e-mail: docvvmakarov@gmail.com
tel.: +38 (067) 951-83-82

Author's contribution: author of the idea, formation of conclusions.

Panasenko Serhii Ivanovich – Doctor of Medical Sciences, Professor, Major of the Medical Service, Head of the Mobile Field Clinic of the Military Medical Clinical Center of the Northern Region Ministry of Defense of Ukraine, Head of the Department of Surgery № 3 of Poltava State Medical University of the Ministry of Health of Ukraine; fl. 14, 9/68, Vatutina Str., Poltava, Ukraine, 36039;

e-mail: panssi@ukr.net
tel.: +38 (050) 410-32-38

Author's contribution: the author of the idea, introduction, formation of conclusions.

Рукопис надійшов
Manuscript was received
26.04.2023

Отримано після рецензування
Received after review
17.05.2023

Прийнято до друку
Accepted for printing
06.07.2023

Опубліковано
Published
30.09.2023