

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
СУМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

Кваліфікаційна наукова праця  
на правах рукопису

**ЧИЖМА РУСЛАНА АНАТОЛІЇВНА**

**УДК 618.11-006.6-071-091.8+577.12(043.3)**

**ДИСЕРТАЦІЯ**

**ПАТОМОРФОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОМІНЕРАЛІЗАЦІЇ ПРИ  
ЗЛОЯКІСНИХ ПУХЛИНАХ ЯЄЧНИКІВ**

222 «Медицина»

22 «Охорона здоров'я»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії.

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,  
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

\_\_\_\_\_ Р.А. Чижма

Науковий керівник – **Москаленко Роман Андрійович**, доктор медичних наук,  
професор, доцент кафедри патологічної анатомії Навчально-наукового  
медичного інституту СумДУ

**Суми – 2024**

## АНОТАЦІЯ

*Чижма Р.А.* Патоморфологічна характеристика біомінералізації при злоякісних пухлинах яєчників. Кваліфікаційна робота на основі рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 222 «Медицина» – Сумський державний університет, МОН України, Суми, 2024.

Зростання показників захворюваності та смертності на злоякісні пухлини жіночої репродуктивної системи є актуальною проблемою сьогодення. Серед злоякісних пухлин жіночої репродуктивної системи рак яєчників займає четверте місце після новоутворень грудної залози, тіла та шийки матки. Однак, незважаючи на те, що рак яєчників має нижчий рівень поширеності в порівнянні з раком грудної залози, летальність при даній патології в три рази вища.

Високий рівень смертності при злоякісних пухлинах яєчників обумовлений безсимптомним перебігом, прогресуванням пухлинного процесу та неефективністю скринінгових методів діагностики. Як правило, пухлини яєчників виявляються на III-IV стадії захворювання, лише в поодиноких випадках діагностуються на I-II стадії. Це в свою чергу, відображається на коефіцієнті п'ятирічної виживаності, який сягає 92 % та 28 % для I-II та III-IV стадії відповідно. Приблизно у 80 % жінок із пізньою стадією раку яєчників спостерігається прогресування або рецидив пухлинного процесу. Це призводить до зниження показників працездатності та повноцінності життя жіночого населення, що становить медико-соціальну проблему світового масштабу. Цілком ймовірно, що такі високі показники смертності зумовлені труднощами в ранній діагностиці або/та часто є випадковою знахідкою раку яєчників при діагностичному обстеженні з причини виникнення ускладнень даної патології або зовсім інших захворювань.

Також, слід зауважити, що результати лікування раку яєчників залежать від багатьох факторів, а саме стадії захворювання, типу пухлинного процесу,

гістогенезу, а також ступеню диференціації. Тим самим, це вкотре свідчить про цінність ранньої діагностики злоякісних новоутворень яєчників.

Дисертаційна робота присвячена актуальній проблемі, а саме покращенні можливостей ранньої діагностики та прогнозуванню перебігу злоякісних пухлин яєчників на тлі процесів патологічної біомінералізації. Для вирішення даної проблеми, аналізу та обґрунтування отриманих результатів використовуються наступні методи дослідження: гістологічні, гістохімічні, імуногістохімічні, фізико-хімічні (сканувальна та просвічувальна електронна мікроскопія, енергодисперсивна рентгенівська спектроскопія, флюоресцентна мікроскопія та хімічний аналіз), морфометричні та інструментально-діагностичні методи (ультразвукова діагностика), статистична обробка даних з використанням параметричних та непараметричних критеріїв.

Для дослідження було вивчено 266 препаратів пухлинної тканини злоякісних новоутворень яєчників. Матеріал був представлений післяопераційними зразками. При цьому, було встановлено, що прояви патологічної біомінералізації спостерігалися у 19.54 % досліджених зразків, які всі були представлені серозними аденокарциномами. Для дослідження методами макроскопічного огляду, ультразвукової діагностики та гістологічного дослідження було відібрано 60 зразків пухлинної тканини: 30 зразків раку яєчників з ознаками біомінералізації (I група) та 30 зразків раку яєчників без ознак біомінералізації (II група).

За результатами наукового дослідження проведено аналіз захворюваності на злоякісні пухлини яєчників в Сумській області за період спостереження (2014 – 2021 років). Проведений порівняльний аналіз даних показників із загальнонаціональними.

У ході дослідження встановлено, що розвиток біомінералізації починається на ранніх етапах канцерогенезу, що може мати важливе значення в ранній діагностиці пухлин яєчників. Біомінерали розміром більше 200 мкм візуалізуються за допомогою ультразвукового дослідження.

Аналіз зображень гістологічного дослідження продемонстрував наявність патологічних біомінералів у вигляді псаммомних тілець (ПТ) у пухлинній тканині яєчника з варіацією кількості від 1 до 200 одиниць. ПТ переважно локалізувались у основі папілярних розростань серозної карциноми яєчників та детриті пухлинної тканини. Значна кількість ПТ знаходилася у товщі сполучної тканини пухлинних вузлів, а також прилеглої інтактної тканини яєчників. Виявлялись як у вигляді поодиноких утворень, так і скупчень, а також рівномірного «висіювання» по всій пухлинній тканині.

Аналіз морфометричних характеристик мінералів на основі зображень гістологічних та імуногістохімічних методів досліджень демонстрував коливання розмірів від 12.6 до 493.7 мкм. Біомінерали за своєю будовою склалися з ламел та міжпластинчастого шару, які розташовані у послідовному порядку. Зазначена послідовність може свідчити про циклічність процесів формування кальцифікованих частинок. При тому, середня товщина міжпластинчастого шару становила 3.7 мкм, а середня товщина ламел дорівнювала 0.65 мкм. Встановлено, що товщина міжпластинчастого шару має прямий сильний кореляційний зв'язок з розмірами мінералів ( $r = 0.79$ ;  $p < 0.001$ ), що може свідчити про етапність формування даних тілець.

Комплексне гістохімічне дослідження зразків (забарвлення алізариним червоним S, за методом фон Косса, PAS-реакцією та Ван Гізоном) дозволило візуалізувати наявність сполук кальцій фосфату як мінеральної основи усіх досліджених біомінеральних частинок та наявність глікопротеїнів, фосфоліпідів та глікозамінокліканів. Це в свою чергу, візуалізувало структурні особливості ПТ, виділяючи ламели та міжпластинчасті шари. При імуногістохімічному дослідженні було встановлено накопичення остеопонтину (OPN) та білка амілоїду (OC) на поверхні патологічних біомінералів. OPN покривав поверхню кальцифікатів з більш інтенсивним накопиченням по краях та між ламелами ПТ. На основі цього, ми можемо говорити про наявність гідроксиапатиту в структурному складі кальцифікатів. Накопичення OC візуалізувалось у структурі патологічних біомінералів, а саме у міжпластинчастих шарах ПТ, що

свідчить про вміст білкового компоненту в структурі даних мінералів. Також, при аналізі імуногістохімічного дослідження у зразках групи раку яєчників з патологічною біомінералізацією встановлено достовірно вищу експресію маркерів OPN ( $p < 0.001$ ), SPARC ( $p < 0.01$ ) та Casp3 ( $p < 0.05$ ). Зазначені результати можуть вказувати як на важливість механізму остеобластичної трансформації клітин пухлини та мікрооточення, так і на помітну роль дистрофічних змін у формуванні патологічних біомінералів.

Не отримано достовірної різниці за критерієм Стьюдента між першою та другою досліджуваними групами при використанні антитіл проти OPG та RANKL. Це свідчить про те, що OPG та RANKL не мають безпосереднього взаємозв'язку з патологічною біомінералізацією. Це пов'язане з тим, що патологічна біомінералізація починає свій розвиток на ранніх етапах канцерогенезу, а OPG та RANKL взаємодіючи між собою на етапах метастазування. Також, не було встановлено достовірної різниці між досліджуваними групами при використанні антитіла проти CD68 та CD163.

За допомогою використання сканувальної електронної мікроскопії (SEM) було встановлено, що кальцифікати являють собою часточки різного розміру, круглої форми з візуалізацією пластинчастих структур, так званих нашарувань. Варіація розмірів нанокристалів біомінеральних депозитів сягала від 8 до 540 нм. Найбільш ймовірні були кристали від 40 до 50 нм, в оточенні дрібних кристалічних часточок. Це в свою чергу свідчить про полідисперсну морфологію нанорозмірних кристалів патологічного депозиту. В EDX спектрах були лінії Ca та P. Співвідношення інтенсивності яких відображало характерні ознаки гідроксиапатиту. За даними карт розподілу елементів встановлено накопичення кальцію (Ca), фосфору (P) та кисню (O) в місцях локалізації кальцифікованих частинок. Відмічався рівномірний розподіл вуглецю (C) по полю сканованого зразка з відсутніми ознаками накопичення в місцях локалізації біомінералів. Дослідження мінералізованої тканини РЯ за допомогою рентген-дифракції та просвітлювальної електронної мікроскопії з

електронною дифракцією було встановлено наявність слідів присутності фази кальциту, про що раніше не повідомлялося.

Проведено хімічний аналіз зразків раку яєчників I групи, а саме порівняльний аналіз елементного складу біомінеральних депозитів (група 1) та прилеглої пухлинної тканини раку яєчників (група 2). Було досліджено, що основним елементом в першій групі було залізо (Fe), а другої групи – магній (Mg).

Так як, дані біомінерали формуються на ранніх етапах канцерогенезу, це дозволить виявляти злоякісні новоутворення яєчників на початкових стадіях розвитку. Це в свою чергу, підтверджує можливість застосування діагностичних інструментальних методів з високою роздільною здатністю для ранньої діагностики раку яєчників.

Отже, даний спосіб оптимізації діагностики злоякісних новоутворень яєчників, ґрунтується на структурних властивостях біомінеральних депозитів пухлинної тканини, що дозволить збільшити точність ранньої діагностики, а також інформативність кінцевого результату на до- і післяопераційних етапах, що не тільки може покращити прогноз, а й зберегти якість життя пацієнток.

***Ключові слова:** рак, яєчники, біомінералізація, псаммомні тільця, гідроксиапатит, кальцит, морфологічні зміни, діагностика, прогностичне значення, імуногістохімія.*

## ANNOTATION

*Chyzhma R.A.* Pathomorphological characteristics of biomineralization in malignant ovarian tumors. Qualification work based on the manuscript.

Dissertation for obtaining the scientific degree of Doctor of Philosophy in specialty 222 «Medicine» - Sumy State University, MES of Ukraine, Sumy, 2024.

The increase in morbidity and mortality rates for malignant tumors of the female reproductive system is an urgent problem today. Among malignant tumors of the female reproductive system, ovarian cancer ranks fourth after neoplasms of the mammary gland, body, and cervix. Although ovarian cancer has a lower prevalence rate compared to breast cancer, the mortality rate for this pathology is three times higher.

The high mortality rate in malignant ovarian tumors is due to the asymptomatic course, the progression of the tumor process, and the ineffectiveness of screening diagnostic methods. As a rule, ovarian tumors are detected at the III-IV stage of the disease; only in isolated cases are they diagnosed at the I-II stage. This is reflected in the five-year survival rate, which reaches 92 % and 28 % for stages I-II and III-IV, respectively. Approximately 80 % of women with late-stage ovarian cancer experience progression or recurrence of the tumor process. This leads to a decrease in indicators of working capacity and quality of life of the female population, which constitutes a medical and social problem on a global scale. It is likely that such high mortality rates are due to difficulties in early diagnosis and are often accidental findings of ovarian cancer during a diagnostic examination due to complications of this pathology or completely different diseases.

It should be noted that the results of ovarian cancer treatment depend on many factors, namely the stage of the disease, the type of tumor process, histogenesis, and the degree of differentiation. Thus, this again proves the value of early diagnosis of malignant neoplasms of the ovaries.

The dissertation work is devoted to an actual problem, namely improving the possibilities of early diagnosis and forecasting the course of malignant ovarian tumors against the background of pathological biomineralization processes. The

following research methods are used for research, analysis, and justification of the obtained results: histological, histochemical, immunohistochemical, physicochemical (scanning and transmission electron microscopy, energy dispersive X-ray spectroscopy, fluorescence microscopy and chemical analysis), morphometric and instrumental diagnostic methods (ultrasound diagnostics), statistical data processing using parametric and non-parametric criteria.

For the study, 266 preparations of tumor tissue of malignant neoplasms of the ovaries were studied. It was established that manifestations of pathological biomineralization were observed in 19.54 % of the examined samples, all represented by serous adenocarcinomas. Sixty samples of tumor tissue were selected for the study: 30 samples of ovarian cancer with signs of biomineralization (group I) and 30 samples of ovarian cancer without signs of biomineralization (group II).

Based on the results of a scientific study, an analysis of the incidence of malignant ovarian tumors in the Sumy region during the observation period (2014-2021) was carried out. A comparative analysis of these indicators with national indicators was carried out.

It was established that the development of biomineralization begins at the early stages of carcinogenesis, which can be important in the early diagnosis of ovarian tumors. Biominerals larger than 200  $\mu\text{m}$  are visualized using ultrasound.

The analysis of histological examination images demonstrated the presence of pathological biominerals in the form of psammoma bodies (PBs) in the tumor tissue of the ovary with a variation in the amount from 1 to 200 units. PBs were localized at the base of papillary growths of ovarian serous carcinoma and tumor tissue detritus. A significant amount of PBs were located in the thickness of the connective tissue of the tumor nodes, as well as in the adjacent intact tissue of the ovaries. They were manifested both in the form of single formations and clusters, as well as uniform "seeding" throughout the tumor tissue.

Analysis of the morphometric characteristics of minerals based on the images of histological and immunohistochemical research methods showed size fluctuations from 12.6 to 493.7  $\mu\text{m}$ . By their structure, biominerals consist of lamellae and an



interlamellar layer, which are located in a sequential order. The specified sequence may indicate the cyclical nature of the formation processes of calcified particles. At the same time, the average thickness of the interlamellar layer was 3.7  $\mu\text{m}$ , and the average thickness of the lamellae was equal to 0.65  $\mu\text{m}$ . It was established that the thickness of the interlamellar layer has a direct strong correlation with the size of the minerals ( $r = 0.79$ ;  $p < 0.001$ ), which may indicate the staged formation of these bodies.

A complex histochemical study of the samples (staining with alizarin red S, according to the von Koss method, PAS-reaction, and Van Gieson) made it possible to visualize the presence of calcium phosphate compounds as the mineral basis of all the investigated biomineral particles and the presence of glycoproteins, phospholipids, polysaccharides, and glycosaminoglycan's. This, in turn, visualized the structural features of PBs, highlighting lamellae and interlamellar layers. Immunohistochemical examination revealed the accumulation of osteopontin (OPN) and amyloid protein (OS) on the surface of pathological biominerals. OPN covered the surface of calcifications with a more intensive accumulation at the edges and between the layers of PB. Based on this, we can talk about the presence of hydroxyapatite in the structural composition of calcifications. Accumulation of OS was visualized in the structure of pathological biominerals, namely in the interlamellar layers of PB, which indicates the content of a protein component in the structure of these minerals. Also, in the analysis of the immunohistochemical study, significantly higher expression of OPN ( $p < 0.001$ ), SPARC ( $p < 0.01$ ), and Casp3 ( $p < 0.05$ ) markers were established in the samples of the ovarian cancer group with pathological biomineralization. These results may indicate the importance of the mechanism of osteoblastic transformation of tumor cells and the microenvironment, as well as the significant role of dystrophic changes in the formation of pathological biominerals.

No significant difference was obtained from the student's test between the first and second studied groups when antibodies against OPG and RANKL were used. This suggests that OPG and RANKL do not directly relate to pathological

biomineralization. This is because pathological biomineralization begins its development at the early stages of carcinogenesis, and OPG and RANKL interact with each other at the stages of metastasis. Also, no significant difference was established between the studied groups when antibodies against CD68 and CD163 were used.

Scanning electron microscopy (SEM) showed that the calcifications are particles of different sizes, round in shape, with visualization of lamellar structures. The size variation of nanocrystals of biomineral deposits ranged from 8 to 540 nm. The most likely were crystals from 40 to 50 nm, surrounded by small crystal particles. This, in turn, indicates the polydisperse morphology of the nanosized crystals of the pathological deposit. In the EDX spectra, there were Ca and P lines. The ratio of their intensities reflected the characteristic features of hydroxyapatite. According to the data of the element distribution maps, the accumulation of calcium (Ca), phosphorus (P), and oxygen (O) in the places of localization and calcified particles were established. There was a uniform distribution of carbon (C) over the field of the scanning sample with no signs of accumulation in the locations of biominerals. The study of the mineralized tissue of the ROC using X-ray diffraction and transmission electron microscopy with electron diffraction established the presence of traces of the calcite phase, which was not previously reported.

A chemical analysis of ovarian cancer samples of the first group was carried out, namely a comparative analysis of the elemental composition of biomineral deposits (group 1) and adjacent tumor tissue of ovarian cancer (group 2). It was investigated that the main element in the first group was iron (Fe), and in the second group - magnesium (Mg).

Since these biominerals are formed in the early stages of carcinogenesis, it will allow the detection of malignant neoplasms of the ovaries in the initial stages of development. This confirms the possibility of using diagnostic instrumental methods with high resolution for early diagnosis of ovarian cancer.

Therefore, this method of optimizing the diagnosis of malignant neoplasms of the ovaries is based on the structural properties of biomineral deposits of tumor

tissue, which will allow for increasing the accuracy of early diagnosis, as well as the informativeness of the final result at the pre-and postoperative stages, which can not only improve the prognosis but also preserve the quality of life female patients.

**Keywords:** *cancer, ovaries, biomineralization, psammoma bodies, hydroxyapatite, calcite, morphological changes, diagnosis, predictive value, immunohistochemistry.*

## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. **Чижма Р.А.**, Біденко М.В., Николенко А.П., Піддубний А.М., Москаленко Р. А. Патологічна біомінералізація при пухлинах яєчників. «Вістник проблем біології і медицини» Випуск 4 (158). 2020 рік, 43-48. *(Дисертантом проведено пошук літератури, її аналіз та узагальнення).*
2. **Чижма Р.А.**, Николенко А.П., Піддубний А.М., Москаленко Р.А. Аналіз захворюваності на злоякісні пухлини яєчників у Сумській області в 2014–2018 рр. Морфологія. 2021;15(1):73-8. *(Дисертантом проведено пошук статистичних даних, їх аналіз, опис результатів та узагальнення висновків).*
3. **Chyzhma R**, Piddubnyi A, Danilchenko S, Kravtsova O, Moskalenko R. Potential Role of Hydroxyapatite Nanocrystalline for Early Diagnostics of Ovarian Cancer. *Diagnostics*. 2021; 11(10):1741. *(Дисертантом проведено гістологічне, гістохімічне, імуногістохімічне дослідження зразків, аналіз отриманих результатів, підготовка статті до друку).*
4. Nyriavenko N, Lyndin M, Sikora V, **Chyzhma R**, Lyndina Y, Sikora K, Awuah WA, Romaniuk A. Neuroendocrine Tumor of the Fallopian Tube and Serous Adenocarcinoma of the Ovary: Multicentric Primary Tumors. *Turk Patoloji Derg*. 2023;39(2):161-166. *(Дисертантом проведено імуногістохімічне дослідження зразків та аналіз отриманих результатів).*
5. **Чижма Р.А.**, Москаленко Р.А.. Імуногістохімічне дослідження раку яєчників з патологічною біомінералізацією. «Одеський медичний журнал», 2023 (4). *(Дисертантом проведено імуногістохімічне дослідження зразків, аналіз отриманих результатів та формулювання висновків).*

**Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:**

6. **Chyzhma R.A.**, Soloviov N.O., Sikora V.V., Piddubnyi A.M. The role of psammoma bodies in the ovarian serous adenocarcinoma (literature review). Biomedical Perspectives II: Abstract book of International Scientific Conference of Students. Postgraduates and Young Scientists. Sumy. October 20-22. 2020. – Sumy: Sumy State University. 2020 – 15. *(Дисертантом проведено пошук літературних джерел, їх аналіз та угальнення).*
7. **R. Chyzhma**, A. Piddubnyi, A. Stepanenko, S. Danilchenko and R. Moskalenko. "Morphology of Nanocrystalline Calcifications of Ovarian Tumors." 2021 IEEE 11th International Conference Nanomaterials: Applications & Properties (NAP). 2021. pp. 1-4. *(Дисертантом проведено підготовку зразків, аналіз отриманих результатів та формулювання висновків).*
8. **Чижма Р.А.**, Піддубний А.М., Степаненко А.О., Данильченко С.М., Москаленко Р.А. Морфологія патологічних біомінералів серозних карцином яєчників. Всеукраїнська міждисциплінарна науково-практична конференція з міжнародною участю «УМСА – століття інноваційних напрямків та наукових досягнень»; 2021 жовтень 8; Полтава. Полтава: Полтавський державний медичний університет; 2021. с 186-188. *(Дисертантом проведено підготовку зразків, аналіз отриманих результатів та формулювання висновків).*
9. **Chyzhma R.**, Litvinec M., Moskalenko R. Morphometrical analysis of serous ovarian carcinoma with Psammoma Bodies. Biomedical Perspectives III: Abstract book of International Medical Conference. Sumy. October 26-28. 2021. – Sumy: Sumy State University. 2021 (3): 92. *(Дисертантом проведено морфометричне дослідження зразків, аналіз отриманих результатів та формулювання висновків).*

10. **R. Chyzhma**, R. Moskalenko. Search for "needles" of hydroxyapatite in the "haystack" of ovarian cancer. Twenty-third Annual Conference YUCOMAT 2022. *(Дисертантом проведено підготовку зразків, аналіз отриманих результатів та формулювання висновків).*
11. **R. Chyzhma**, A. Piddubnyi, A. Stepanenko, O. Pylypenko and R. Moskalenko. "The Study of the Nanocrystalline Structure of Psammoma Bodies of Serous Ovarian Carcinoma." 2022 IEEE 12th International Conference Nanomaterials: Applications & Properties (NAP). 2022. pp. NRA03-1-NRA03-4. *(Дисертантом проведено гістологічне, імуногістохімічне, морфометричне дослідження зразків, аналіз отриманих результатів та формулювання висновків).*
12. **Chyzhma R**, Moskalenko R. Expression of Osteopontin in serous ovarian carcinoma. 35th European Congress of Pathology; 09–13 September 2023 (Dublin, Ireland); Berlin, Germany: Springer. Virchows Archiv: 2023; 483 (Suppl 1):S256. *(Дисертантом проведено імуногістохімічне дослідження, аналіз отриманих даних та формулювання висновків).*
13. **Chyzhma R**, Moskalenko R. PROSPECTS FOR THE USE OF PATHOLOGICAL BIOMINERALIZATION IN THE DIAGNOSIS OF OVARIAN CANCER. The scientific paradigm in the context of technological development and social change: Scientific monograph. Part 2. Riga.Latvia: "Baltija Publishing". 2023. 464 p. ISBN: 978-9934-26-297-5. *(Дисертантом проведено гістологічне, гістохімічне, імуногістохімічне, морфометричне дослідження зразків, аналіз отриманих результатів та формулювання висновків).*
14. **R. Chyzhma** and R. Moskalenko, "Trace Elements as a Specific Marker for Ovarian Cancer Biomineralization," 2023 IEEE 13th International Conference Nanomaterials: Applications & Properties (NAP), Bratislava, Slovakia, 2023, pp. NRA08-1-NRA08-4, doi: 10.1109/NAP59739.2023.10310855. *(Дисертантом проведено імуногістохімічне дослідження зразків, аналіз отриманих результатів та формулювання висновків).*

15. **Чижма Р. А.,** Москаленко Р. А. Експресія остеобластичних маркерів в тканині раку яєчників з патологічною біомінералізацією. «Актуальні проблеми патологічної анатомії», 5-6 жовтня 2023 р., «Український науково-медичний молодіжний журнал», №4, doi: 10.32782/2226-2008-2023-4-7.

*(Дисертантом проведено імуногістохімічне дослідження зразків, аналіз отриманих результатів та формулювання висновків).*

## ЗМІСТ

|  |     |
|--|-----|
| Перелік умовних позначень, символів, скорочень і термінів  | 17  |
| Вступ  | 18  |
| Розділ 1. Огляд літератури   |     |
| 1.1. Злоякісні новоутворення яєчників: епідеміологія, етіологія, класифікація, діагностика               | 25  |
| 1.2. Патологічна біомінералізація при злоякісних новоутвореннях яєчників                                 | 34  |
| 1.3. Особливості метастазування раку яєчників  | 46  |
| Розділ 2. Матеріали та методи  | 52  |
| Розділ 3. Епідеміологія злоякісних пухлин яєчників у Сумській області впродовж 2014–2021 рр.             | 58  |
| Розділ 4. Дослідження тканини злоякісних новоутворень яєчників з ознаками патологічної біомінералізації  | 62  |
| Розділ 5. Дослідження тканини злоякісних новоутворень яєчників без ознак патологічної біомінералізації   | 77  |
| Розділ 6. Структурний та фізико-хімічний аналіз біомінеральних включень злоякісних новоутворень яєчників | 87  |
| Розділ 7. Аналіз та узагальнення результатів дослідження   | 95  |
| Висновки   | 121 |
| Практичні рекомендації   | 123 |
| Примітки   | 124 |
| Список використаної літератури   | 126 |
| Додатки  | 158 |



## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

РЯ – рак яєчників.

ВООЗ – Всесвітня організація охорони здоров'я.

HGSC – серозна карцинома високого ступеня злоякісності.

LGSC – серозна карцинома низького ступеня злоякісності.

УЗД – ультразвукова діагностика.

СА-125 – раковий антиген 125.

МРТ – магнітно-резонансна томографія.

КТ – комп'ютерна томографія.

ОКТ – оптична комп'ютерна томографія.

ВСУЗД – внутрішньосудинне ультразвукове дослідження.

ПБМ – патологічна біомінералізація.

ПТ – псаммомні тільця.

ПАМ – пухлинно-асоційовані макрофаги.

ПЕМ – просвітлювальна електронна мікроскопія.

СЕМ – сканувальна електронна мікроскопія.

ЕДС – енергодисперсійна спектроскопія.

ІГХ – імуногістохімічне дослідження.

OPN – остеопонтин.

OPG – остеопротегерин.

RANKL – активатор рецептору ядерного кВ-ліганду.

SPARC – остеонектин.

Casp3 – каспаза 3.

Col 1 – колаген I.

ЕМП – епітеліально-мезенхімальний перехід.

TNF – фактор некрозу пухлин.

## ВСТУП

**Актуальність.** Рак яєчників (РЯ) посідає четверте місце серед найбільш поширених онкологічних захворювань жіночої репродуктивної системи [1]. Смертність при раку яєчників сягає найбільшого значення, ніж будь-яка злоякісна пухлина даної системи [2]. Більшість випадків діагностуються на етапах метастазування пухлинного процесу. Метастазуючи в ділянку черевної порожнини та тазу, цим самим знижуючи показник виживаності та сприятливість перебігу РЯ [3].

За даними ВООЗ у 2020 році було зареєстровано 313 958 випадків РЯ у всьому світі, а кількість смертей сягала 207 252 [4]. Існують географічні відмінності захворюваності та смертності раку яєчників. Найвищий рівень захворюваності спостерігається в країнах Центральної та Східної Європи складаючи 10.7 випадків на 100 тис. населення [5]. Найнижчий показник характерний для країн Східної Азії та Африки сягаючи 5.7 та 4.4 випадків на 100 тис. населення відповідно [6].

Варіація у рівнях захворюваності та смертності залежить від ряду факторів, таких як використання оральних контрацептивів, фізичні навантаження, гормональний фон та сімейний анамнез [7]. Також важливу роль відіграє віковий фактор, адже близько 80 % випадків РЯ діагностується у жінок віком старше 45 років [8].

Існуючі скринінгові методи діагностики мають низьку прогностичну цінність. Оскільки, детальне гінекологічне обстеження разом із трансвагінальним ультразвуковим дослідженням (УЗД) та лабораторним маркером, таким як аналіз ракового антигену-125 (СА-125) є основними стратегіями раннього виявлення [9]. В той же час, вони не демонструють значного успіху в ранній діагностиці раку яєчників і не впливають на сприятливість перебігу або смертність від даної патології [10].

Найпоширенішим гістологічним типом епітеліального раку яєчників є серозна карцинома. Серозні карциноми поділяються на пухлини низького (low-grade) та високого (high-grade) ступеня злоякісності [11].

Патологічна біомінералізація (ПБ, кальцифікація) є однією з клінічних особливостей злоякісних новоутворень яєчників. Зустрічається у 8 % випадків раку яєчників, переважно при серозних карциномах [12]. Для серозних карцином ПБ представлена у вигляді псаммомних тілець (ПТ) [13]. Гістологічно частота виникнення ПТ при серозних карциномах низького та високого ступеня злоякісності сягає 100 % та 50 % відповідно [14]. Відомо, що патологічні біомінерали починають свій розвиток на ранніх етапах канцерогенезу. Важливо відмітити, що наявність біомінералів при раку яєчників сприяє зростанню показників 5-річної виживаності до 50 % [15]. Однак, існує ряд невирішених проблем, пов'язаних зі складністю розуміння механізму виникнення патологічних біомінералів, їх безпосередньої ролі в ранній діагностиці та прогнозі даного захворювання.

Отже, детальне вивчення структурних особливостей патологічних біомінералів при раку яєчників допоможе покращити рівень ранньої діагностики даної патології, цим самим зберегти життя жіночого населення.

#### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.**

Дисертаційне дослідження проведене згідно плану наукового дослідження кафедри патологічної анатомії Навчально-наукового Медичного інституту Сумського державного університету та є частиною науково-дослідної теми «Стан мінералізованих тканин при застосуванні нових композитів з наночастинками  $Ag^+$  та  $Cu^+$ » (№ держреєстрації 0121U100471, термін виконання 2021 – 2023 роки).

Тема дисертації затверджена вченою радою Сумського державного університету МОН України (протокол № 4 від 21 жовтня 2021 року).

**Мета дослідження.** Встановити патоморфологічні особливості патологічної біомінералізації при злоякісних пухлинах яєчників, з'ясувати структуру, хімічний склад біомінералів та оцінити їх вплив на імуногістохімічні характеристики пухлин.

**Завдання дослідження:**

1. Провести статистичний аналіз показників захворюваності на злоякісні новоутворення яєчників в Сумській області та Україні за період 2014 – 2021 роки на основі даних Національного канцер-реєстру України та статистичного відділу Сумського обласного клінічного онкологічного центру.

2. Встановити імуногістохімічні особливості тканини злоякісних новоутворень (серозних карцином) яєчників з ознаками біомінералізації та злоякісних новоутворень яєчників без ознак біомінералізації.

3. Визначити структурні особливості біомінеральних утворень тканини раку яєчників за допомогою фізико-хімічних методів дослідження.

4. Провести порівняльний аналіз хімічного складу патологічних біомінералів та оточуючих тканин злоякісних пухлин яєчників.

5. Оцінити роль остеобластичних маркерів у розвитку патологічної біомінералізації раку яєчників.

*Об'єктом дослідження* є злоякісні новоутворення яєчників з біомінералізацією.

*Предметом дослідження* є клініко-морфологічні, морфометричні, імуногістохімічні та фізико-хімічні особливості тканини злоякісних новоутворень яєчників з біомінералізацією.

*Методи дослідження:*

1. Ультразвукова діагностика: вивчення особливостей тканини злоякісних новоутворень яєчників та патологічних біомінералів.

2. Макроскопічний метод: візуальне дослідження пухлинної тканини з та без ознак біомінералізації.

3. Гістологічний метод: забарвлення пухлинної тканини гематоксиліном та еозином.

4. Гістохімічний метод: забарвлення гістологічних препаратів злоякісних новоутворень яєчників за фон Коссом, алізариновим червоним S, методом Ван-Гізона, PAS-ракцією.

5. Імуногістохімічний метод із використанням наступної панелі антитіл до різних білків: остеопонтину (OPN), остеопротегерину (OPG), остеонектину (SPARC), ліганду ядерного фактора-кВ (RANKL), каспази-3 (Casp3), амілоїду (OC), макрофагального кластера диференціації 163 (CD163), макрофагального кластера диференціації 68 (CD68).

6. Флюоресцентна мікроскопія з використанням наступних комбінацій антитіл: I – CD68 + OPN; II – CD68 + рецепторів колагену типу I (Col I).

7. Морфометричний метод: визначення основних величин структурних складових тканини злоякісних новоутворень яєчників з біомінералізацією.

8. Сканувальна та просвічувальна електронна мікроскопія.

9. Рентгендифракція патологічних біомінералів.

10. Хімічний аналіз складу патологічних біомінералів та пухлинної тканини.

11. Статистичний метод: використання параметричних та непараметричних показників.

**Наукова новизна отриманих результатів.** У дисертаційній роботі проведено аналіз та характеристику епідеміологічного статусу раку яєчників серед жіночого населення як Сумської області так і України в цілому. За результатами проведеного аналізу було встановлено ряд факторів, які безпосередньо впливають на динаміку даного захворювання. Було досліджено групу зразків раку яєчників з патологічною біомінералізацією з використанням УЗД, імуногістохімічної панелі антитіл, а саме остеобластичних, макрофагальних та додаткових маркерів, а також фізико-хімічних методів та морфометрії. Ґрунтуючись на проведеному ультразвуковому дослідженні пацієнтів з РЯ та проаналізованих наукових джерелах було встановлено, що патологічні біомінерали менше 200 мкм не візуалізуються за допомогою даного методу діагностики. Було встановлено статистично достовірну різницю експресії таких остеобластичних маркерів, як OPN та SPARC між першою (з патологічною біомінералізацією) та другою (без патологічної біомінералізації) досліджуваними групами. Дослідження експресії макрофагальних маркерів,

таких як CD68 (M1-макрофагів) та CD163 (M2-макрофагів) продемонструвало відсутність статистично достовірної різниці між досліджуваними групами. При аналізі експресії Casp3 в досліджуваних групах встановлено достовірну різницю між групою I та II. Також, встановлено накопичення ОС (*Anti-Amyloid Fibrils*) у структурі патологічних біомінералів. При застосуванні фізико-хімічних методів дослідження співвідношення Ca/P в ділянках патологічних біомінералів РЯ відповідало гідроксиапатиту. Вперше було встановлено присутність кальциту серед мінеральних фаз патологічної біомінералізації РЯ. Морфометричне дослідження показало, що біомінерали в своїй будові мають міжпластинчастий шар та ламели, які в цілому характеризуються, як псаммомні тільця. Отже, біомінеральні включення мають різні структурні особливості, що безпосередньо вказує на різні механізми їх формування та подальший розвиток.

**Практичне застосування отриманих результатів.** За результатами дисертаційного дослідження було встановлено, що розвиток патологічної біомінералізації починається на ранніх етапах канцерогенезу, що має важливе значення саме в ранній діагностиці пухлин яєчників. Біомінерали розміром більше 200 мкм візуалізуються за допомогою ультразвукового дослідження. Встановлено достовірно вищий рівень імуногістохімічної експресії остеопонтину у групі РЯ з біомінералізацією. Виявлено сполуки кальцій фосфату в складі патологічних біомінералів, які за співвідношенням Ca/P відповідали зрілому гідроксиапатиту. Це дозволяє розглядати даний феномен у якості потенційної діагностичної ознаки для ранньої діагностики раку яєчників.

Результати дисертаційного дослідження можуть бути використані в практичній діяльності лікарів-патологанатомів, лікарів-онкологів, лікарів-гінекологів та лікарів-радіологів.

Матеріали дисертаційної роботи впроваджені в навчальний процес на кафедрі патологічної анатомії Буковинського державного медичного університету, кафедрі загальної та клінічної патології Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна, кафедрі морфології, клінічної патології та судової медицини Національного університету охорони здоров'я

України імені П.Л. Шупика, кафедри патологічної анатомії та судової медицини Полтавського державного медичного університету. Результати дисертаційного дослідження використовуються у практичній діяльності лікарів з діагностичною метою в гінекологічному відділенні «Клініки жіночого здоров'я» медичного центру Флоріс-С, патологоанатомічного відділення КНП СОР «Сумської обласної клінічної лікарні» та медичному центрі хірургічного профілю «Надія».

**Особистий внесок дисертанта.** Дисертантка самостійно створила дизайн дослідження, сформулювала мету та завдання, провела пошук зразків, виконала гістологічне, гістохімічне, імуногістохімічне та флюоресцентне, морфометричне дослідження зразків пухлинної тканини. Здобувачка самостійно провела пошук та аналіз літературних джерел. Виконала статистичний аналіз отриманих результатів та їх тлумачення, визначення основних положень, які виносяться на захист дисертаційної роботи. Сформулювала висновки та оформила матеріали дисертації. Сканувальна та просвічувальна електронна мікроскопія, рентгенівська дифракція були проведені в Інституті прикладної фізики НАН України з консультацією кандидата фізико-математичних наук С.М. Данильченка.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення дисертаційної роботи оприлюднені на: Міжнародній науково-практичній конференції BIOMEDICAL PERSPECTIVES II (м. Суми, Україна, 2020 р.), Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «УМСА – століття інноваційних напрямків та наукових досягнень» (м. Полтава, Україна, 2021 р.), Міжнародній науково-практичній конференції BIOMEDICAL PERSPECTIVES III (м. Суми, Україна, 2021 р.), Міжнародній конференції NAP-2021 (м. Одеса, Україна, 2021 р.), Міжнародній конференції YUCOMAT 2022 (м. Герцег-Нові, Чорногорія, 2022 р.), Міжнародній конференції NAP-2022 (м. Краків, Польща, 2022 р.), 35-му Європейському конгресі патологів (м. Дублін, Ірландія, 2023 р.), Міжнародній конференції NAP-2023 (м. Братислава, Словаччина, 2023 р.),

Науково-практична конференція «Актуальні проблеми патологічної анатомії» (м. Київ, Україна, 5-6 жовтня 2023 р.).

**Публікації.** За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 15 наукових праць: 5 статей, з яких 3 – у наукових фахових виданнях України, 2 – в закордонному журналі, які індексується наукометричною базою Scopus (Q2 та Q3), 1 – розділ монографії. За час роботи над дисертацією отримані результати були представлені у матеріалах 9 конференцій та конгресів, 5 з яких обліковуються наукометричними базами даних Scopus та Web of Science.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертаційна робота викладена на 174 сторінках друкованого тексту, складається з анотації (українською та англійською мовами), вступу, огляду літератури, розділу матеріалів та методів, результатів проведених досліджень (розділ 3-6), аналізу та узагальнення результатів дослідження, висновків, практичних рекомендацій, приміток, списку використаної літератури та додатків. Дисертаційна робота містить 55 рисунків, 7 таблиць та 235 використаних джерел (5 кирилицею та 230 латиницею).



## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1. Злоякісні новоутворення яєчників: епідеміологія, етіологія, класифікація, діагностика

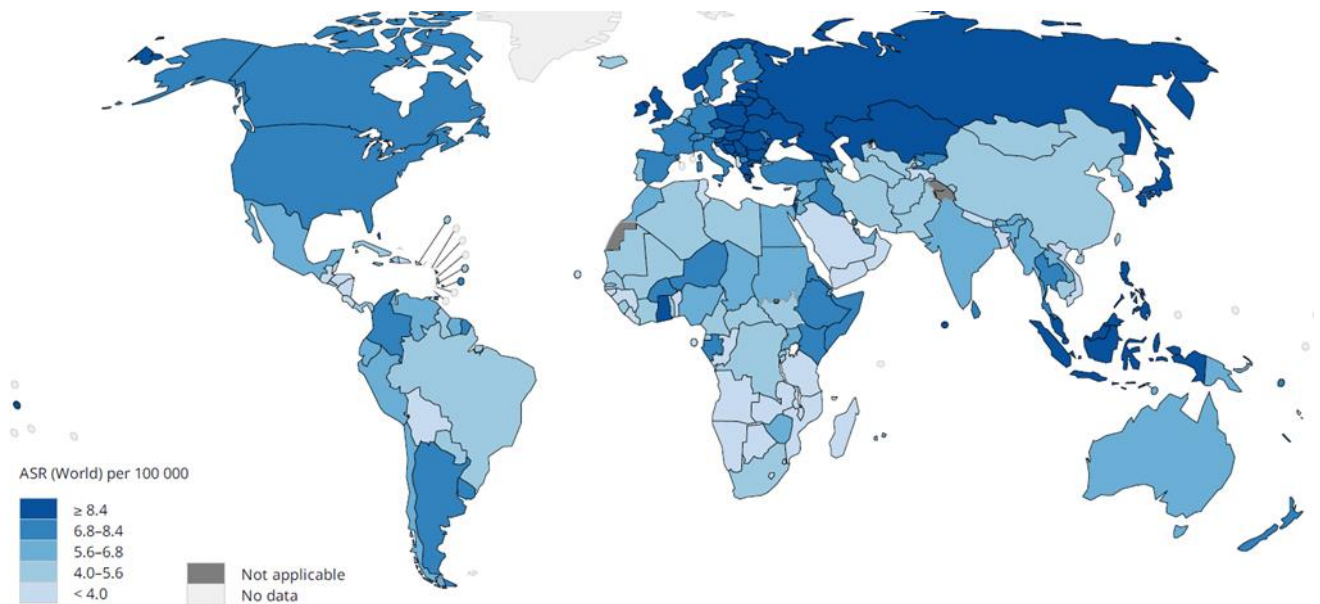
##### *Епідеміологія*

Злоякісні пухлини жіночої репродуктивної системи посідають провідне місце у загальній структурі онкологічної захворюваності та з кожним роком демонструють тенденцію до зростання [2, 16]. Серед злоякісних пухлин РЯ займає четверте місце після новоутворень молочної залози, тіла та шийки матки [17]. Незважаючи на те, що РЯ має нижчий рівень поширеності в порівнянні з раком молочної залози, летальність при даній патології в три рази вища [18].

Високий рівень смертності при злоякісних пухлинах яєчників обумовлений безсимптомним перебігом, прогресуванням пухлинного процесу та неефективністю скринінгових методів діагностики [7]. Як правило, пухлини яєчників виявляються на III-IV стадії захворювання, лише в поодиноких випадках діагностуються на I-II стадії [19]. Це в свою чергу, відображається на коефіцієнті п'ятирічної виживаності, який сягає 92 % та 28 % для I-II та III-IV стадії відповідно [18, 20]. Приблизно у 80 % жінок із пізньою стадією РЯ спостерігається прогресування або рецидив пухлинного процесу. Це призводить до зниження показників працездатності та повноцінності життя жіночого населення, що становить медико-соціальну проблему світового масштабу [21]. Цілком ймовірно, що такі високі показники смертності зумовлені труднощами в ранній діагностиці або / та часто є випадковою знахідкою РЯ при обстеженні з причини ускладнень або іншої патології.

Також, слід зауважити, що результати лікування РЯ залежать від багатьох факторів, а саме стадії захворювання, типу пухлинного процесу, гістогенезу, а також ступеню диференціації. Тим самим, це вкотре свідчить про значимість ранньої діагностики злоякісних новоутворень яєчників.

Найвищий показник захворюваності відзначається в індустріально розвинених країнах світу, зокрема Центральної та Східної Європи, в цілому показник становить 10.7 випадків на 100 тис. населення [4]. В той же час, найнижчий спостерігаються у країн Африки та Східної Азії, складаючи 4.4 та 5.7 випадків на 100 тис. населення відповідно [5]. Слід зауважити, що в Україні показник захворюваності становить 11.3 випадків на 100 тис. жіночого населення, зокрема Сумська область характеризується досить високим рівнем злякисних новоутворень яєчників (12.5 випадків на 100 тис. жіночого населення) [22].



*Рис 1.1. Показник захворюваності на рак яєчників серед жіночого населення станом на 2020 рік.*

### ***Етіологія***

Надзвичайна поширеність пухлин яєчників пов'язана з впливом багатьох факторів, таких вік жінок (45-70 років), збільшення кількості овуляторних циклів (раннє менархе та/або пізній постменопаузальний період, а саме підвищення гіпоталамо-гіпофізарної активності), генетична схильність та гінекологічні захворювання, включаючи синдром полікістозних яєчників, ендометріоз та запальні захворювання органів малого тазу [23, 24].

Одним з найбільш критичних факторів ризику РЯ є сімейний анамнез раку яєчників та/або молочної залози. При виявленні даних патологій у родичів першої лінії, ризик розвитку РЯ збільшується у 3 рази [25]. Генетичний фактор характеризується мутаціями таких генів, як BRCA, KRAS, BRAF, ERBB2, CTNNB1, PTEN, PIK3CA, ARID1A, PPP2R1A та TP53 [26]. Жінки із спадковим анамнезом виявлення РЯ зазвичай мають мутації в BRCA1 і BRCA2, які є провісниками ризику виникнення даної патології [27]. BRCA1 бере безпосередню участь у відновленні дволанцюгових розривів шляхом розривів гомологічної рекомбінації. В той же час, BRCA2 служить основою для інших білків, які беруть участь у репарації дволанцюгової ДНК, переважно через дефектну гомологічну рекомбінацію, а також стабілізує комплекси RAD51-ssDNA. Поряд з тим на BRCA1 та BRCA2 припадає приблизно 15 % усіх випадків злоякісних новоутворень яєчників. Встановлено, що носії мутації BRCA1 у 40-50% мають ризик виникнення неоплазій яєчників протягом життя. в той же час, носії мутації BRCA2 мають ризик виникнення даної патології у 20-30 % [28]. При тому, Seksit Chirasophon et al. дослідили, що до 30 % пацієток з діагностованим раком яєчників мають спадкові фактори ризику. Вони ідентифікували мутації зародкових ліній у 28.6 % пацієток, з яких 11.4 % припадали на мутацію BRCA, 5.7 % – мутація генів HR, 8.6 % – мутації MMR та 2.9 % складала мутації інших генів [26-28]. Також, варто відмітити, що синдром Лінча є причиною 10 – 15 % усіх випадків спадкового раку яєчників, а ризик виникнення раку яєчників у осіб із даним синдромом у сімейному анамнезі становить 6 – 8 % [29].

Виділяють ряд факторів, які сприяють зниженню ризику виникнення даної патології: вагітність, лактація та прийом оральних контрацептивів [30-32]. Досліджено, що використання оральних контрацептивів є фактором захисту від серозного раку яєчників, знижуючи ризик виникнення пухлинного утворення близько на 60 % порівняно з хворими, які не використовували оральні контрацептиви. При тому, зниження ризику виникнення може тривати до 30 або більше років після їх використання [33]. Однак, винятком є муцинозні

пухлини. Оскільки, при даному гістологічному типу не встановлено зниження виникнення даної патології за умови прийому оральних контрацептивів [34]. Гіпотеза «безперервної овуляції» свідчить про те, що кількість овуляторних циклів збільшує швидкість поділу клітин, який безпосередньо пов'язаний з відновленням поверхневого епітелію після кожного овуляторного циклу, тим самим це збільшує ризик виникнення спонтанних мутацій [24]. Встановлено, що при відсутності овуляторних циклів протягом 8.7 років знижується ймовірність розвитку даного захворювання в чотири рази [35, 36]. Також відомо, що жінки, які народжували, мають на 30 – 60 % менший ризик, на відмінну від жінок, які не народжували [37]. При цьому, кожна наступна доношена вагітність знижує ризик приблизно на 15 %. Оскільки, вважалось, що всі типи раку яєчників походили з епітелію клітинної поверхні яєчників, а під час овуляції епітеліальні клітини зазнають так званої фізичної травми та миттєво відновлюються [36-37]. Протягом життєвого циклу жінки овуляція відбувається неодноразово, призводячи до повторних травм епітелію, що врешті-решт спричиняє пошкодження клітинної ДНК. В той же час, епітеліальні клітини з пошкодженням ДНК є більш піддатливими до змін, що в свою чергу полегшує інвагінацію в кортикальну строму [38]. Внаслідок даної інвагінації утворюється сфера з епітеліальними клітинами у стромі, яка називається кістою кортикального включення. Перебуваючи всередині тканини яєчника, епітеліальні клітини піддаються гормональному впливу, які в свою чергк стимулюють проліферацію клітин, що з часом призводить до переродження на пухлинні клітини [36-39]. Однак даний фактор виникнення не може пояснити патогенез різних гістологічних типів раку яєчників.

Доведено, що замісна гормональна терапія підвищує ризик розвитку раку яєчників у жінок у постменопаузі. Встановлено, що терапія тільки естрогеном збільшує ризик виникнення раку яєчників на 22 %, в той же час комбінована терапія естрогеном і прогестероном збільшує ризик на 10 % [39]. Проте, також встановлено, подібне підвищення ризику виникнення даної патології, зокрема серозних та ендометріюїдних карцином, у жінок з постменопаузальним

синдромом, які отримували замісну терапію, незалежно від того була монотерапія естрогеном чи комбінація естрогену з прогестероном [39-40]. В той же час, що при застосуванні замісної гормональної терапії було встановлено зниження ризику світлоклітинного раку [40].

Фактори способу життя мають також безпосередній вплив на розвиток того чи іншого злоякісного новоутворення. В Канаді було проведено дослідження стосовно взаємозв'язку ризику виникнення раку яєчників та харчуванням. Було запропоновано дієту з високим вмістом вітамінів групи В, а саме В6 та фолієвої кислоти [40-41]. На основі цього, встановлено, що вживання овочів сприяє зниженню ризику виникнення раку яєчників на 39 % [41]. Також, сюди ж відносять цільнозернові продукти та знежирене молоко. В той же час, надмірне вживання кількості жирів (тваринних) в раціоні сприяють зростанню ризиків до 30 %, а молочні продукти – на 60 % [42, 43]. Фізична активність має захисний ефект, цим самим зменшує ризики виникнення. Відповідно малорухливий спосіб життя та ожиріння ці ризики підвищують [44]. Центральне ожиріння відіграє вагомую роль в розвитку раку яєчників, за рахунок перетворення андрогенів в жировій тканині. Даний фактор збільшує ризики на 36 % [45].

### **Класифікація раку яєчників**

Згідно класифікації ВООЗ (2020 р.), відповідно до гістогенезу виділяють: епітеліальні, мезенхімальні, змішані епітеліально-мезенхімальні, пухлини строми статевого тяжа, пухлини зародкових клітин (до яких відносять герміногенні, монодермальні тератоми та пухлини соматичного типу), змішані [46]. В п'ятому виданні виділяють п'ять основних гістотипів раку яєчників: серозна карцинома високого ступеня злоякісності (*high-grade serous carcinoma (HGSC)*), серозна карцинома низького ступеня злоякісності (*low-grade serous carcinoma (LGSC)*), муциозна карцинома (*mucinous carcinoma (MC)*), ендометріоїдна карцинома (*endometrioid carcinoma (EC)*) і світлоклітинна карцинома (*clear cell carcinoma (CCC)*) [47]. Оскільки гістотипи виникають з

клітин різного походження, специфічні для клітинної лінії діагностичні імуногістохімічні маркери та специфічні для гістотипу онкогенні зміни можуть підтвердити морфологічний діагноз [48].

Встановлено, що близько 90 % первинних злоякісних пухлин яєчників є епітеліально-стромальними, серед яких виділяють основні гістологічні типи: серозний, ендометріоїдний, муцинозний та світлоклітинний [49]. При цьому, 70 % становлять саме серозні аденокарциноми яєчників [50]. Крім того, серозні карциноми поділяються на пухлини низького (low-grade) та високого (high-grade) ступеня злоякісності, для яких характерна мутація генетичного матеріалу [51]. Low-grade серозна карцинома характеризується мутацією таких генів, як KRAS та BRAF, в той же час high-grade – TP53 та BRCA1/2, які в свою чергу забезпечують диференційно-діагностичне та прогностичне значення пухлинного процесу [52, 53]. Досить цікавим явищем є утворення кальцифікатів при серозних пухлинах яєчників low-grade та high-grade, що становить 100 % та 50 % відповідно [54]. Однак незважаючи на досить високу частоту їх поширення, прогностична значимість та діагностична цінність кальцифікатів наразі до кінця не з'ясовані.

Low-grade (високодиференційовані) серозні карциноми складають близько 5 % всіх серозних карцином. Макроскопічно пухлина представлена множинними вогнищами сосочкових розростань, які зливаються між собою, Також візуалізується у вигляді кістозних утворень, які виповнені рідким прозорим або/та кров'яним вмістом, можлива наявність ділянок некрозу. Зовнішня поверхня яєчників є гладкою або горбистою за рахунок масивних сосочкових розростань [55, 56]. Близько у 22 % візуально незміненому сальнику при мікроскопічному дослідженні виявляються ознаки метастазування. При мікроскопічному дослідженні виявляються папілярні та залозисті структури з низьким або помірним ядерним поліморфізмом, поодинокими ядерцями та рідкими мітозами (< 2–3 в 10 полях зору). Метастазує зазвичай в сальник, очеревину, тазові та параортальні лімфатичні вузли, виявляючись при цьому у 40 – 70 % на III стадії захворювання [57].

High-grade (низькодиференційовані) серозні карциноми складають 50 % всіх злоякісних новоутворень яєчників. Макроскопічно представлені у вигляді солідного компоненту з наявними кістозними порожнинами, на стінці яких візуалізуються розростання по типу кольорової капусти [58]. Характерні поширені некротичні зміни, які досить часто розповсюджуються на поверхню яєчника. Мікроскопічно карциноми даного типу представлені у вигляді ділянок солідного росту та сосочкових розростань [59]. Сосочки можуть формувати складні сосочково-залозисті, псевдосолідні та криброзні структури. Крім того, наявний так званий комедонекроз, який відображається некрозом епітелію верхівки сосочків. Для high-grade серозних карцином характерна виражена ядерна атипія, множинні химерної конфігурації ядра, низьке ядерно-цитоплазматичне співвідношення [60, 61].

### *Діагностика*

Симптоми РЯ є неспецифічними, тому їх доволі легко пропустити або/та спутати із іншими патологічними процесами, це в свою чергу значно ускладнює діагностичні можливості на ранніх стадіях [62]. Адже, більш чітка специфічність проявляється на пізніх стадіях захворювання (III – IV) та включає поєднання симптомів, таких як здуття живота, нудота, раннє насичення, порушення акту дефекації та сечовипускання, прояви асцити, а також біль в спині, швидка втомлюваність та втрата ваги [63].

При I стадії захворювання пальпаторно в черевній порожнині пухлинне утворення не виявляється. На II стадії захворювання вузлове утворення може пальпуватися в порожнині малого тазу при бімануальному ректовагінальному дослідженні [64]. III стадія характеризується пальпаторним визначенням через черевну стінку вище та нижче пупка метастазів у великий сальник. На IV стадії захворювання виявляється плевральний випіт з правого боку та / або з обох сторін. При карциноматозі очеревини розвивається асцит та кишкова непрохідність [65]. Однак, етіологія асцити при раку яєчників є недостатньо вивченою, але до клінічні та клінічні спостереження показали, що саме

васкулярний ендотеліальний фактор росту (VEGF) відповідає за його розвиток. Крім того, накопичення асцитичної рідини безпосередньо пов'язане з обструкцією лімфатичних судин пухлинними клітинами [63, 64]. У більшості випадків асцитична рідина раку яєчників складається із пухлинних клітин, великої кількості лейкоцитів та високого рівня лактатдегідрогенази [65].

Детальне гінекологічне обстеження разом з трансвагінальним УЗД та лабораторним маркером (раковим антигеном-125) є ключовими в ранній діагностиці раку яєчників [9]. Однак, вони не показали значної цінності в ранній діагностиці даної патології. Відсутність ефективної стратегії раннього виявлення є основною з причин несвоєчасної діагностики та лікування цього захворювання, що призводить до несприятливості перебігу та зниженню показників п'ятирічної виживаності [62].

Досліджено, що виявлення ракового антигену-125 ефективно як онкомаркеру в лікуванні новоутворень яєчників, а не для скринінгу [66]. Раковий антиген-125 (CA-125) – є високомолекулярним глікопротеїном, який виявляється в крові за умови епітеліального раку яєчників [67]. Близько у 50 % досліджених випадків він демонструє високі значення на ранніх стадіях захворювання та у 90 % виявляється у пацієток із прогресуючою формою РЯ [68]. Однак, у кожної жінки є власний базовий рівень СА-125, і лише при значному підвищенні вище базового можна ідентифікувати злоякісний пухлинний процес. Також, відомо, що підвищення рівня СА-125 спостерігається при таких фізіологічних та патологічних станах доброякісного характеру, як ендометріоз, кісти яєчників, вагітність та запальні захворювання очеревини. Тому, вимірювання рівня СА-125 у сироватці крові є не точним і досить часто було зареєстровано хибно позитивні результати при доброякісних захворюваннях. [69].

В той же час, чутливість виявлення при трановагінальному УЗД сягає 85 %, специфічність – 98.7 %, при тому позитивна цінність даного дослідження складає 14.01 %, а негативна 99.9 %, цим самим знецінюючи даний метод в ранній діагностиці. Адже, трансвагінальне УЗД дозволяє виявити пухлинне



утворення, але досить тяжко від диференціювати доброякісний процес від злоякісного [70]. Особливо важко класифікувати кістозні утворення з одним осередком кісти та папілярними утвореннями, але без інших солідних компонентів. Однак, досить важливо від диференціювати прикордонні пухлини від інвазивних злоякісних пухлин яєчників на ранніх та пізніх стадіях захворювання, оскільки від цього залежить подальше лікування та прогноз захворювання. При тому, Landolfo С. та співавт. дослідили, що їх неможливо відрізнити за допомогою урахування наявних ультрасонографічних ознак [71, 72].

Провести точну диференційну діагностику дозволяє біопсія тканини яєчника. Чутливість даного методу складає 100 %, специфічність – 86 %, цим самим підтверджуючи високу ефективність [73]. Однак, даний метод є інвазивним та не використовується в ранній діагностиці для скринінгу даної патології. Іншими методами для візуалізації раку яєчників є магнітно-резонансна томографія (МРТ) із чутливістю та специфічністю до виявлення злоякісності процесу в діапазоні між 91 – 92 % та 91 – 100 % відповідно; та позитронно-емісійна томографія / комп'ютерна томографія (ПЕТ/КТ) з чутливістю 52 – 58 %, специфічністю 76 – 78 %. Не дивлячись на високу чутливість та специфічність, використання даних методів в скринінгу / ранній діагностиці РЯ не підтверджено [74].

*Таблиця 1.1.1. Порівняння чутливості та специфічності діагностичних методів до виявлення раку яєчників.*

| <b>Метод</b>        | <b>Чутливість</b> | <b>Специфічність</b> |
|---------------------|-------------------|----------------------|
| Біопсія             | 100 %             | 86 %                 |
| Трансвагінальне УЗД | 85 %              | 98.7 %               |
| МРТ                 | 91 – 92 %         | 91 – 100 %           |
| ПЕТ/КТ              | 52 – 58 %         | 76 – 78 %            |

## 1.2. Патологічна біомінералізація при злоякісних новоутвореннях яєчників

Відомо, що однією з клінічних особливостей прояву РЯ є патологічна біомінералізація (ПБМ, кальцифікація) та виявляється близько у 8 % випадків при дослідженні за допомогою комп'ютерної томографії [12, 75]. Так, процес патологічної біомінералізації у тканині яєчника представлений псаммомними тільцями (ПТ) та кальцифікацією капсули і строми пухлинних вузлів (рис. 1.2.1) [76]. Вважається, що у цьому випадку відкладання кальцію відбувається у дегенерованій або некротичній тканині при нормальному рівні кальцію у сироватці крові та за відсутності порушень метаболізму кальцію в організмі [77]. ПТ – пластинчасті кальциновані структури, які розташовані у вигляді концентричних кіл [13, 78]. Наявність ПТ слугує достовірною патогномонічною ознакою при діагностиці неоплазій яєчників та виявляються як за допомогою інструментально-діагностичних методів дослідження, таких як ультразвукова діагностика, комп'ютерна та магнітно-резонансна томографія, так і при гістологічному аналізі [79, 80].

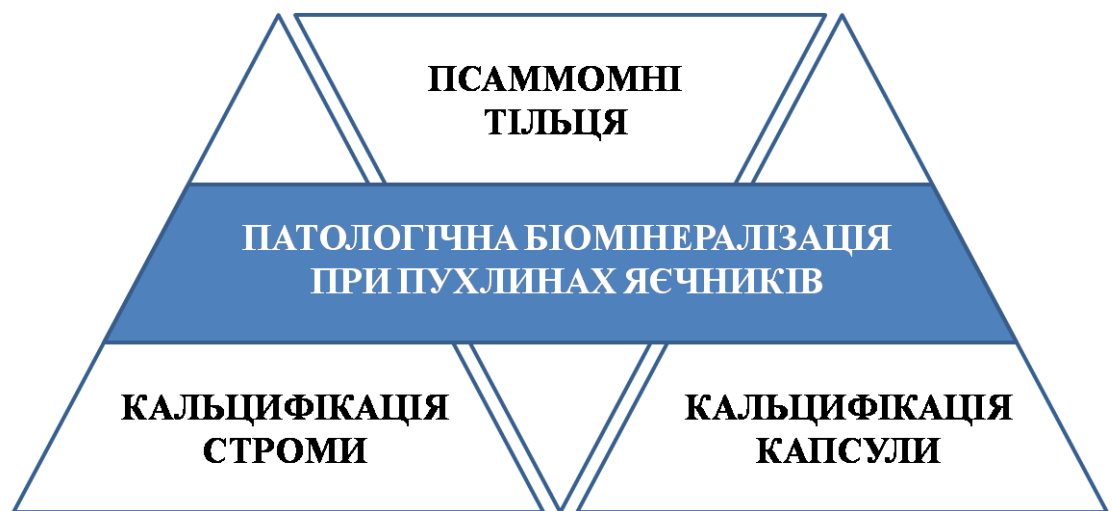


Рисунок 1.2.1. Схема патологічної біомінералізації при пухлинах яєчника.

У дослідженнях Ferenczy та співавт. за допомогою електронної мікроскопії було встановлено, що утворення ПТ відбувається внутрішньоклітинно, як в гістіоцитах строми, так і в неопластичних клітинах [13, 81]. В той же час, дослідження Wen J. та співавт. показують, що кальцифікати раку яєчників виявляються переважно у стромі пухлини, а не в

епітелії [12]. Однак, не зважаючи на локалізацію даних біомінералів, їх наявність сприяє зростанню показників п'ятирічної виживаності при пухлинах яєчників до 50 % [13].

На основі цих даних було встановлено, що процес кальцифікації не пов'язаний з клітинною дегенерацією, так як епітеліальні клітини пухлин більш схильні до некротичних змін і характеризуються швидкою проліферацією [76].

Незважаючи на це, деякі автори дотримуються іншої думки, що утворення кальцифікатів при пухлинах яєчників більш схоже з метастатичною кальцифікацією, яка асоціюється з гіперкальціємією та може виникати в нормальних тканинах [82]. З іншого боку, K. Das та співавт., схиляються до думки, що процес кальцифікації може бути пов'язаний із секрецією колагену пухлинними клітинами [13]. У той же час Silva та співавт. стверджують, що процес кальцифікації переважає в матриці пухлини, що може бути спровокований саме комбінованою дією гормонів (пролактин, хоріонічний гонадотропін людини, естрадіол, естрон, соматотропний гормон та тестостерон) [76]. Це свідчить про вторинний процес формування патологічної біомінералізації саме на тлі прогресування пухлинного росту [12, 13, 75, 83]. Цілком ймовірно, що в патогенезі формування кальцифікатів у пухлині яєчників беруть участь декілька механізмів.

Цікавою теорією є зв'язок ПБМ з діяльністю грамнегативних нанобактерій з роду *Chlamidia*, які здатні осаджувати солі кальцію та сприяють утворенню кальцинованих відкладень (псаммомних тілець) [84]. Згідно проведених досліджень *in vitro*, нанобактерії чинять цитотоксичну дію на клітини ссавців і мають здатність проникати через гематоплацентарний бар'єр [85].

В той же час, васкулярна кальцифікація при раку яєчників характеризується заміщенням скорочувальної здатності гладеньких м'язів судин на кальцифікуючу, за рахунок експресії факторів транскрипції та білків кісткового матриксу, що в свою чергу свідчить про подібність процесу мінералізації до остеогенезу [86].

Таким чином, на основі даних огляду ми дійшли висновку, що існує декілька гіпотез, які пояснюють процес утворення ПТ та кальцифікації в цілому.

Важливим кроком для кращого розуміння ролі біомінералів в тканині пухлини стало дослідження їх хімічного складу. Так, на основі даних Olivera-Merlin P.S. et al стало відомо про наявність неорганічних елементів у складі ПТ при серозній формі РЯ, а саме: алюмінію (Al), кадмію (Cd), калію (K), кобальту (Co), хрому (Cr), заліза (Fe), цинку (Zn) та міді (Cu). Дане дослідження було виконане за допомогою виділених кальцифікатів з парафінових блоків шляхом плазмово-емісійної спектрофотометрії [87]. В той же час, Fanl M. та співавт. за даними аналізу енергодисперсійної рентгенівської спектроскопії у складі ПТ виявили кальцій (Ca), фосфор (P) і у значно меншій кількості магній (Mg) та натрій (Na) [78]. Yaman та співавт. встановили, що в складі ПТ порівняно з тканиною раку яєчників містилося в 12 разів більше міді (Cu); близько в 10 разів більше кадмію (Cd), кальцію (Ca) та заліза (Fe); магнію (Mg) та цинку (Zn) було більше в 5 разів [88]. Підвищення концентрації даних елементів в ПТ пояснюють модифікацією білків, які беруть участь в метаболічній регуляції катіонів та/або забруднення навколишнього середовища. Також, відмінності у показниках вмісту хімічних елементів можна пояснити гетерогенністю пухлин, етнічними відмінностями жінок та/або місцем їх проживання (де важлива роль відводиться впливу екзогенних чинників на організм).

Цинк (Zn) та мідь (Cu) є незамінними мікроелементами, які приймають безпосередню участь у метаболізмі клітин, відіграючи важливу роль у ферментативних системах, регулюючи активність ферментів. В той же час, гомеостаз цих мікроелементів регулюється декількома компенсаторними механізмами, які регулюють їх концентрацію. Також, сюди відносять транспортери, імпортери та металотіонеїни [87-89].

Zn – мікроелемент, який відіграє роль у зростанні, диференціації та апоптозі клітин [89]. Також бере участь в імунних реакціях, окисному стресі. Низький рівень Zn знижує цитотоксичність і активність Т-кілерів [90]. Зміни

концентрації Zn впливають на набутий та вроджений імунітет. Це відображається на механізмах протипухлинної активності імунної системи. При процесах канцерогенезу антиоксидантні властивості Zn сприяють пригніченню пухлинного росту. Варто відмітити, що Zn активує транскрипційний фактор-1 (MTF-1), який є клітинним датчиком Zn. В той же час, MTF-1 підтримує гемостаз цинку шляхом прямого зв'язування з високо консервативними шести цинковими доменами [90, 91]. MTF-1 захищає окислювальний стрес, транскрипційно регулюючи цільові гени, такі як металотіонеїн. Встановлено, що транскрипційний фактор-1 функціонує як онкоген при злоякісних пухлинах яєчників, за рахунок активації епітеліально-мезенхімальної трансформації (EMT) [89-91]. Отже, це в свою чергу свідчить про те, що Zn може сприяти EMT шляхом активації MTF-1 у пухлинних клітинах яєчників [91].

Рівень міді є регульованим і його дисбаланс сприяє розвитку та прогресуванню злоякісних процесів [92]. Ступінь залежності пухлинних клітин від метаболізму мітохондрій визначає чутливість клітин до іонів міді. Відсутність білків, які безпосередньо пов'язані із метаболізмом міді, призводить до накопичення іонів даного елемента в пухлинних клітинах, цим самим призводячи до безпосередньої стійкості пухлини до променевої терапії. Встановлено, що порушення метаболізму міді може сприяти розвитку пухлинного процесу шляхом активації сигнальних шляхів, пов'язаних з проліферацією пухлинних клітин та ре моделюванням стромального та запального мікрооточення. Cu має проангіогенні властивості та індукує міграцію ендотеліальних клітин на ранніх стадіях ангіогенезу [93]. Це прямо пов'язано із ростом, інвазією та метастазуванням злоякісних пухлин. Адже, ангіогенез є невід'ємною частиною пухлинного процесу [94].

Відомо, що співвідношення Cu/Zn був запропонований як маркер РЯ. Дана модель використовувалась для прогнозування даної патології. Зміна рівня концентрації одного з даних мікроелементів може спричинити дисбаланс та призвести до так званої конкуренції за засвоєння. Відносно низький рівень Zn та в той же час, підвищення рівня Cu призводить до активації механізмів

окислювального стресу, погіршення антиоксидантних властивостей багатьох ферментів [92-94]. Зміна співвідношення рівнів концентрації даних мікроелементів були виявлені при різних патологіях, включаючи дегенеративні, запальні та імунологічні захворювання. Окрім цього, завдяки безпосередньої ролі Zn та Cu в механізмах окислювального стресу та хронічного запалення було встановлено про їх вплив на процеси канцерогенезу, що й сприяло використанню даного співвідношення в діагностиці РЯ [94].

Встановлено, що надлишок заліза (Fe) сприяє ініціації пухлини та її росту [95]. Також посилює не лише проліферацію, а й інвазію та метастазування [96]. Fe сприяє інвазивності процесу через індукцію IL-6 [97]. В той же час, при порушенні гомостазу заліза, воно бере безпосередню участь у реакціях Фентона (двовалентне ( $\text{Fe}^{2+}$ ) залізо відновлює перекис водню ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) з утворенням гідроксильних радикалів (OH)). Даний процес призводить до формування активних форм кисню, які сприяють фероптозу, морфологічно відмінній формі неапоптозної смерті клітин [95, 96]. Крім того, надмірна експресія ядерного коактиватора 4, який бере участь у процесах вивільнення заліза з феритину, цим самим сприяючи ферроптотичній відповіді. При цьому, модуляція фероптотичних та феритинофагічних процесів виснажує внутрішньоклітинне залізо, цим самим перешкоджає так зване виживання пухлинних клітин [96, 97].

Низький рівень магнію (Mg) підвищує вміст активних форм кисню, які мутують ДНК, а отже породжують генетичну нестабільність [98]. Відомо, що дефіцит Mg затримує ріст первинної пухлини, але посилює метастазування [99]. Гіпомагніємія прогнозує зниження виживаності пацієнтів із прогресуючим РЯ [100]. В той же час, висока концентрація внутрішньоклітинного Mg може представляти селективну перевагу для трансформованих клітин. Mg утворює комплекси з АТФ, АДФ та ГТФ, що є необхідною складовою в активації ферментів, залучених у перенесення фосфатних груп, таких як фосфофруктокіназа, фосфогліцераткіназа, глюкокіназа та піруваткіназа, а також ферментів гліколізу [98-100]. Це в свою чергу, слугує основним шляхом, який використовується пухлинними клітинами для продукування енергії, навіть

незважаючи на присутність кисню. Також, варто відмітити, що Mg утворює комплекси з ДНК-полімеразою, аденілциклазами, рибонуклеазами, фосфодіестеразами, гуанілатциклазами, АТФазами та ГТФ-фазами. В той же час, це дозволяє приймати безпосередню участь у метаболізмі нуклеїнових кислот та білків, а також передачі сигналів. Крім того, Mg активує теломеразу, рибонуклеопротеїн, який відповідає за підтримку кінцевих повторів теломерів та надання їм не обмеженого реплікативного потенціалу [99]. Саме завдяки реактивації активності теломеразы трансформовані клітини стають «безсмертними».

Досить цікавим є дослідження Wen J. та співавт. стосовно молекулярних основ кальцифікації в яєчниках. Було доведено, що в кальцинованих серозних карциномах яєчників наявні такі біомаркери мінералізації, як BMP-2, OPN, Runx2 та Osterix [12]. BMP-2 – є типовим представником білків сімейства BMP (bone morphogenetic protein), який безпосередньо залучений в процес остеогенезу та сприяє посиленню кальцинації клітин [101]. Відомо, що саме кісткоутворюючі білки (BMP – bone morphogenetic protein) активують процес ектопічної кальцифікації на молекулярному рівні та слугують шляхом для передачі сигналів. Індукуючи швидке фосфорилування Smad 1/5/8 та Erk, MAPKs. Також, спостерігалось посилення експресії мРНК Id1, Smad 6 та Snail [102]. Також, варто відмітити, що BMP-2 діє через два типи серинових/треонінових рецепторів. Рецепторами типу I слугують BMPR1 $\alpha$  / Alk3 та BMPR1 $\beta$  / Alk6, а до рецепторів типу II відносяться BMPR2 та ActRІІА [100, 102]. Рецептори типу I фосфорилуються за допомогою рецепторів типу II після процесів олігомеризації. З двох сигнальних шляхів для BMP найважливішим є Smad-залежний шлях. Smad 1/5/8 – це медіатори BMPR1 $\alpha$  та BMPR1 $\beta$ , крім цього Smad6 та Smad7 є інгібіторами для данього шляху. Слід зазначити, що експресія BMP-2 в пухлинних тканинах зворотно корелює з виживаністю. Ці дані, свідчать про те, що секреція BMP-2 клітинами епітеліального раку яєчників в пухлинному середовищі сприяють модифікації поведінки пухлинних клітин за рахунок зміни їх рухливості та адгезії [103].

OPN (остеопонтин) – кзаклітинний матриксний фосфоглікопротеїн, який секретується остеобластами та епітеліальними клітинами різних органів. Він регулює такі фізіологічні процеси, як резорбція кісткової тканини, загоєння ран, васкуляризація та імунна відповідь. Патологічні стани, такі як метастатичні процеси та / або дефекти пост трансляційної модифікації спричиняють зміни в його функціях. Варто зауважити, що однією із функцій OPN є інгібування кальцифікації кісткової тканини, що забезпечує контроль біомінералізації. Відомо, що білок OPN, який секретується макрофагами, активованими Т-клітинами та лейкоцитами безпосередньо впливає на відкладання фосфату кальцію, що в подальшому призводить до формування псаммомних тілець [104]. Крім того, було встановлено, що при пухлинах яєчників також надмірно експресується OPN. Встановлено, що цей білок за рахунок активації сигнального шляху PI3K / Akt / HIF-1 $\alpha$  / p53 регулюючи HIF-1 $\alpha$  забезпечує безпосередній вплив на проліферацію, ангиогенез, метастазування та адгезію пухлинних клітин [105].

Такі фактори транскрипції, як Runx2 та Osterix відіграють значну роль в диференціюванні, забезпеченні регуляції проліферації, а також дозріванні остеобластів [106]. Слід зазначити, що основною функцією Runx2 в контексті раку є сприяння метастатичному процесу. Встановлено, що при припиненні експресії Runx2 пригнічується епітеліально-мезенхімальна трансформація та знижується експресія факторів безпосередньо пов'язаних з процесами ангиогенезу [103, 105]. Крім того, пухлинні клітини з більш високою експресією Runx2 мають більш виражену здатність до міграції, частково за рахунок активації генів безпосередньо пов'язаних з епітеліально-мезенхімальною трансформацією, таких як MMP 2, MMP 9, MMP 13, BSP [104, 106]. Також, варто зауважити, що білки Runx2 можуть бути фактором перебудови так званого ландшафту хроматину [105, 106]. Osterix, також відомий як SP7, є транскрипційним фактором. Osterix зазвичай експресується остеобластами для регуляції дозрівання та диференціювання остеобластів, в той же час його експресія прямо чи опосередковано регулюється за рахунок різних факторів,



включаючи BMP-2 та Msx2 [102-104]. Встановлено, що Osterix полегшує метастазування раку до кісткової тканини, за рахунок посилення експресії когорти генів, які в свою чергу сприяють етапам метастатичного каскаду. До цих генів відносяться MMP 9, VEGF, IL-8, PTHrP та MMP 13. Також, Osterix може зв'язуватись з ядерним фактором активованих T-клітин, цим самим утворюючи комплекс, який сприяє формуванню кісткової тканини шляхом стимуляції промоторної активності колагену типу I ( $\alpha 1$ ). Osterix регулює диференціацію преостеобластів у зрілі остеобласти після взаємодії з патогенетичними ланками Runx2. Також, слід зауважити, що Osterix забезпечує регуляцію експресію остеогенних факторів, включаючи остеонектин, остеопонтин, остеокальцин та лужну фосфатазу [103, 105].

На основі проведених досліджень було встановлено, що в умовах кальцифікації при пухлинах яєчників значно посилюється експресія BMP-2 та OPN в порівнянні з відсутністю ознак мінералізації тканини. Однак щодо експресії Runx2 та Osterix статистично значної різниці не було виявлено, але все-таки в умовах кальцифікації вона була вищою [102-106]. Разом з тим, встановлено, що цитоплазма клітинних ліній раку яєчників (SKOV3) багата везикулами, які містять в своєму складі щільні гранули, подібні за структурним складом до везикул остеобластів. Насамперед, це свідчить про безсумнівну роль остеогенного диференціювання мезенхімальних клітин в процесах ПБМ при пухлинах яєчників [107].

Відомо, що більшість структур людського організму знаходяться в іонній рівновазі з кров'ю, а кров є метастабільним розчином  $\text{Ca}^{2+}$  і  $\text{PO}_4^{3-}$  [108]. За рахунок того, що в крові наявні інгібітори мінералізації, які стабілізують метастабільний розчин, дані патологічні біомінерали не утворюються по всьому тілу [109]. При нормальній біомінералізації скелетної тканини матричні везикули сприяють зниженню рівня інгібіторів кальцифікації. Більшість матричних везикул містять в своєму складі білки, які забезпечують підтримку мінералізації в цілому [110].

Таблиця 1.2.1. Біомаркери мінералізації при пухлинах яєчників.

| <b>БИОМАРКЕР<br/>МІНЕРАЛІЗАЦІЇ</b> | <b>МЕХАНІЗМ ДІЇ</b>   | <b>ЕКСПРЕСІЯ В<br/>УМОВАХ<br/>КАЛЬЦИФІКАЦІЇ</b> | <b>АВТОР</b>                                 |
|------------------------------------|---|---|--|
| <b>BMP-2</b>                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>активує процес ектопічної кальцифікації на молекулярному рівні та слугує шляхом для передачі сигналів</li> <li>сприяє посиленню кальцинації клітин</li> </ul>  | <b>ЗНАЧНО<br/>ПОСИЛЮЄТЬСЯ</b>                   | Wen J. та співав.                            |
| <b>OPN</b>                         | <ul style="list-style-type: none"> <li>сприяє відкладанню фосфату кальцію, що в подальшому призводить до формування псаммомних тілець</li> </ul>  | <b>ЗНАЧНО<br/>ПОСИЛЮЄТЬСЯ</b>                   | Wen J. та співав.<br>Maki M. та співав.      |
| <b>OPNc</b>                        | <ul style="list-style-type: none"> <li>регулюючи HIF-1<math>\alpha</math> забезпечує вплив на проліферацію, ангиогенез, метастазування та адгезію пухлинних клітин</li> </ul>   | <b>ЗНАЧНО<br/>ПОСИЛЮЄТЬСЯ</b>                   | Zhao H. та співав.                           |
| <b>Runx2 /<br/>Osterix</b>         | <ul style="list-style-type: none"> <li>відіграють значну роль в диференціюванні, забезпеченні регуляції проліферації, а також дозріванні остеобластів</li> </ul>  | <b>НЕЗНАЧНО ВИЩА</b>                            | Wen J. та співав.<br>Wang Z.Q. та співав.    |
| <b>OPG</b>                         | <ul style="list-style-type: none"> <li>регулює гомеостаз ре моделювання кістки, запобігаючи зв'язуванню RANKL з його рецептором RANK</li> <li>є фактором виживання та може блокувати TRAIL апоптоз у пухлинних клітинах</li> </ul>  | <b>ПОСИЛЮЄТЬСЯ</b>                              | Lane D. та співав.                           |
| <b>SPARC</b>                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>знижує продукцію білка-1 хемоатрактанта макрофагів та його хемоатрактичний ефект на макрофаги</li> <li>послаблює реакцію пухлинних клітин на мітогенні та проінвазивні ефекти білка-1 хемоатрактанта макрофагів, цим самим зменшуючи пухлинні клітини, які безпосередньо індуковані макрофагами</li> </ul> | <b>ПОСИЛЮЄТЬСЯ</b>                              | Said N. A. та співав.<br>Chen J. та співав.  |
| <b>RANKL</b>                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>регулятор кісткового метаболізму</li> <li>RANKL експресований на остеобластах, активує передачу сигналів RANK і транскрипційну активацію остеобластів, які сприяють остеокластогенезу та резорбції кісток.</li> </ul>  | <b>ПОСИЛЮЄТЬСЯ</b>                              | Wieser V. та співав.<br>Panizo S. та співав. |

Саме тому, як тільки клітини починають продукувати матричні везикули, підвищується утворення патологічних біомінералів у так званих слабких місцях, а саме, ділянках запалення, некротичних змін та пухлинного процесу [111]. Вважається, що матричні матричні везикули накопичують кальцій та неорганічний фосфат і перенасичення випадають в осад у вигляді галчастих кристалів гідроксиапатиту ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})$ ), зростання яких врешті-решт руйнує мембрану безпосередньо самої матричної везикули. При трансмісійній електронній мікроскопії дані кристали мають спікули або стрічкоподібну структуру. А за розміром кристалічні утворення сягають 50 нм, шириною 25 нм та висотою – 10 нм. З часом їх ріст може продовжуватись в екстравезикулярному просторі з утворенням більш стабільних кристалів та / або поширюватись на колагенових фібрилах [109-111]. Також, встановлено, що матричні везикули стимулюють сигнальний каскад, подібний формуванню нормальної скелетної тканини. В той же час, одним із наслідків даного механізму є утворення матричних везикул, що в свою чергу свідчить про безперервність їх вивільнення та активацію сигнального каскаду знов і знов [112].

Матричні везикули та мітохондрії зазвичай ініціюють кальцифікацію через взаємодію ферментів фосфатази з фосфоліпідами, що зв'язують кальцій, обидва з яких пов'язані з мембраною [113].

Також, важливим компонентом у формуванні твердих тканин є лужна фосфатаза, яка досить високо виражена в мінералізованих клітинах м'яких тканин [114]. Лужна фосфатаза є важливою групою ферментів, які відіграють безпосередню роль в організмі людини. Дані ферменти каналізують гідроліз фосфатних ефірів при лужному рівні рН, це в свою чергу призводить до утворення неорганічного фосфату. Крім того, за рахунок підвищення локальної концентрації неорганічного фосфату, відбувається стимуляція мінералізації. В той же час, лужна фосфатаза сприяє зниженню концентрації позаклітинного пірофосфату, цим самим інгібуючи мінеральне формування [115]. Позаклітинний пірофосфат слугує потужним фізико-хімічним інгібітором

формування та безпосереднього розвитку кристалів гідроксиapatиту. В той же час, позаклітинний пірофосфат синтезується з позаклітинного АТФ за допомогою ектонуклеотидної пірофосфатази / фосфодіестерази, тоді як пірофосфат гідролізується до фосфату тканинно-неспецифічною лужною фосфатазою, що сприяє утворенню кристалів гідроксиapatиту [113]. Варто зауважити, що аномальна експресія лужної фосфатази безпосередньо пов'язана із декількома молекулярними шляхами.

До них відноситься активація шляху Wnt /  $\beta$ -катеніну, який пов'язаний із збільшенням експресії лужної фосфатази при багатьох типах раку, включаючи рак кісткової тканини, печінки та товстої кишки [114, 115].

$\beta$ -катенін транслокується до ядра та сприяє транскрипції гена, що в свою чергу призводить до збільшення продукування саме лужної фосфатази. Також, існує шлях активації кісткового морфо генетичного білка (BMP), що призводить до збільшення експресії лужної фосфатази пухлинними клітинами, з більш вираженою експресією в кісткових метастазах солідних пухлин, оскільки саме там пухлинні клітини набувають остеобластичних ознак [100, 113]. Окрім того, активація опосередкованих інтегрином сигнальних шляхів, таких як кіназа фокальної адгезії або Rho GTPases, може спричинити посилення експресії лужної фосфатази, цим самим сприяючи інвазії пухлинних клітин та їх метастазуванню. Однак, з іншого боку, варто зазначити, що дефіцит лужної фосфатази також може мати негативні наслідки для хворих із злоякісними новоутвореннями. Оскільки, це пов'язано з тим, що знижена активність лужної фосфатази може свідчити про зниження диференціації пухлинних клітин, тобто вони набувають здатності до неконтрольованого росту. Також, низький рівень лужної фосфатази може сприяти підвищенню проліферації ракових клітин в організмі [115].

Деякі дослідження показали, що псаммомні тільця можуть створювати бар'єр для поширення неопластичних клітин і навіть призводити до їх загибелі. Цим самим сприяють регресії пухлини на ранній стадії розвитку [83]. Це непрямо підтверджується результатами радіологічного контролю лікування

злюкисних пухлин яєчників: кальцифікація частіше зустрічається у високодиференційованих пухлинах з низькою злюкисністю, а після проведеного лікування наявність біомінералізації у перитонеальних метастазах підвищується до 16% [116]. В той же час на пізніх стадіях розвитку кальцифікація може бути результатом біологічних змін пухлини і навпаки свідчити про прогресування та несприятливий прогноз [117].

Ґрунтуючись на проведеному аналізі літературних джерел, ПБМ при пухлинах яєчника можна розділити на кальцифікацію пухлинної паренхіми, капсули та стромі, а також такий особливий прояв біомінералізації як ПТ. Кальцифікація паренхіми раку яєчників частіше визначають як вторинні зміни пухлинної тканини за рахунок секреції колагену пухлинними клітинами та безпосередньої дії гормонів [76]. З іншого боку, розвиток біомінералізації у капсулі та стромі чи ПТ можна розглядати як один із варіантів захисної реакції тканин на поширення та інвазивний ріст новоутворення [13].

Також рядом авторів відмічається варіація поширеності кальцифікації при різних гістологічних варіантах пухлин яєчників. Наприклад, висока частота виявлення проявів ПБМ характерна для серозної аденокарциноми, а для серозних аденокарцином з великою кількістю псаммомних тілець була виокремлена окрема нозологічна одиниця – «псаммокарцинома» [118]. Очевидно, що при гістологічному дослідженні частота виявлення ознак ПБМ очікується вищою, тому що дрібні кальцифікати (менше 200 мкм) не виявляються радіологічними методами [119].

Однак детальні відомості про поширеність ПБМ при пухлинах яєчників, які б базувалися на деталізованому гістологічному і гістохімічному дослідженні на сьогодні відсутні.

### 1.3. Особливості метастазування раку яєчників

Однією з особливостей раку яєчників є унікальна поведінка метастатичного процесу даного захворювання [19, 120, 121]. Адже, вона помітно відрізняється від класичної моделі метастазування, яка притаманна для більшості типів раку різних локалізацій. Дана модель включає в себе кілька етапів інтра- та екстравазації і лише після цього утворюються метастази в інших органах [122]. В той же час, пухлини яєчника метастазують за так званим пасивним механізмом. Після того, як пухлинні клітини відокремлюються від первинного новоутворення яєчника у вигляді поодиноких клітин та/або їх скупчень, за рахунок фізіологічного руху перитонеальної рідини вони циркулюють до очеревини та сальника, де й формують пухлинні імпланти [123]. Цікавим фактом раку яєчників є те, що дані імпланти проникають у шари мезотеліальних клітин, при тому досить рідко сягають глибоких шарів очеревини [124].

Відомо, що пухлинні клітини перед тим, як від'єднатись та розпочати свою метастатичну подорож, підлягають трансформації епітелію в мезенхіму [125]. Це в свою чергу, послаблює міжклітинні зв'язки пухлинних клітин та полегшує прикріплення епітеліальних клітин до базальної мембрани [126]. Трансформовані клітини нагадують фібробласти, набуваючи інвазивного фенотипу та активно проліферують [127]. Пухлинні клітини яєчника після формування метастатичної колонії в тканині сальника та очеревини, зазнають переходу від мезенхімального до епітеліального фенотипу. Це дозволяє їм підтримувати швидкий ріст та реагувати на паракринні фактори росту [128].

Однією з молекул, важливих для адгезії епітеліальних клітин вважається саме E-кадгерин, який являється мембранним глікопротеїном, розташованим на з'єднаннях клітинних адгезій [129]. E-кадгерин з'єднується за допомогою  $\alpha$ - і  $\beta$ -катеніну з мікрофіламентами актину в цитоплазмі, при цьому прикріплюючи епітеліальні клітини одна до одної [130]. В цілому, зниження рівня E-кадгерину при епітеліальному раку яєчників корелює з трансформацією епітелію в мезенхіму та набуттям інвазивного фенотипу. При серозних карциномах

яєчників експресія E-кадгерину пухлинних клітин, які наявні в асцитичній рідині та ділянках метастазування нижча, порівняно з первинним вогнищем ураження. Крім того, пухлинні клітини з низькою експресією є більш інвазивними [131]. Зниження експресії гену E-кадгерину пов'язане з посиленою регуляцією транскрипційних репресорів Sip1/ZEB2, Snail та Slug, цим самим пригнічуючи його транскрипцію [132]. Під час епітеліально-мезенхімальної трансформації розщеплення E-кадгерину призводить до дестабілізації з'єднань адгеринів та вивільнення  $\beta$ -катеніну, який слугує транскрипційним активатором для проліферації клітин. В той же час, епітеліально-мезенхімальна трансформація та мезенхімально-епітеліальний перехід, який є зовсім протилежним процесом, не є бінарними процесами. Описано, що в даному випадку, пухлинні клітини піддаються частковій епітеліально-мезенхімальній трансформації та демонструють гібридний епітеліальний/мезенхімальний фенотип, який може бути з більш агресивним пухлинним процесом та підвищеною хіміорезистентністю, в порівнянні з пухлинними клітинами, які в свою чергу мають епітеліальні чи мезенхімальні особливості [131, 133].

Під час злоякісної трансформації, епітеліальні клітини втрачають взаємодію між клітинами (опосередковану E-кадгерином) активізуючи інші кадгерини, такі як N- та P-кадгерин [133]. N-кадгерин служить індикатором поточної епітеліально-мезенхімальної трансформації, а його експресія корелює із тим чи іншим типом раку. N-кадгерин сприяє ангиогенезу та сприяє підтримці цілісності кровоносних судин, обволікаючи ендотеліальні клітини для забезпечення стабілізації мікросудин. Втрата N-кадгерину призводить до активації неопластичних процесів та збільшення їх частоти виникнення у онкогенній моделі K-ras<sup>G12D</sup>, це в свою чергу свідчить про те, що він може функціонувати як супресор росту. Підтвердженням цьому є описані випадки в літературі про метастатичну дисемінацію за умови зниження регуляції N-кадгерину [131, 133].

За рахунок кластеризації інтегринів ( $\alpha_2\beta_1$ - та  $\alpha_3\beta_1$ -інтегрин), які забезпечують зв'язування колагену, на пухлинних клітинах індукується матриксна металопротеїназа (ММР-9) [134]. ММР-9 розщеплює ектодомен Е-кадгерину, цим самим послаблюючи міжклітинну адгезію, що дозволяє трансформованим клітинам у вигляді окремих клітин або їх скупчень (сфероїдів) поширюючись на тканину очеревини та сальника [135]. Оскільки, втрата Е-кадгерину пухлинними клітинами призводить до метастатичної дисемінації та активації факторів транскрипції епітеліально-мезенхімальної трансформації [133-135].

Слід зауважити, що кадгерини є молекулами клітинної поверхні та безпосередньо залучені в  $\text{Ca}^{2+}$  - залежний механізм адгезії клітин. Кадгерини є досить чутливими до  $\text{Ca}^{2+}$  та легко розкладаються шляхом протеолізу за відсутності  $\text{Ca}^{2+}$ .

За умови гематогенного шляху метастазування раку яєчників. компоненти комплексу фокальної адгезії регулюються надходженням  $\text{Ca}^{2+}$  [136]. Таке підвищення концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  може бути за рахунок надходження через  $\text{Ca}^{2+}$ -залежні канали та/або вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з внутрішньоклітинного ендоплазматичного ретикулуму. При цьому, активуючи рецептори ріанодину та/або інозитолтрифосфату. Дані сигнали стимулюють такі ефектори, як  $\text{Ca}^{2+}$ -залежна кіназа легкого ланцюга міозину, забезпечуючи її фосфорилування та скорочення міозину II, цим самим полегшуючи міграцію пухлинних клітин [137].

Одним із ускладнень / наслідків РЯ може бути відкладення кальцію в стінці черевної порожнини та черевної стінки. Зазвичай виявляються у вигляді дрібних вузликів, округлої форми з кальцинованою структурою [138].



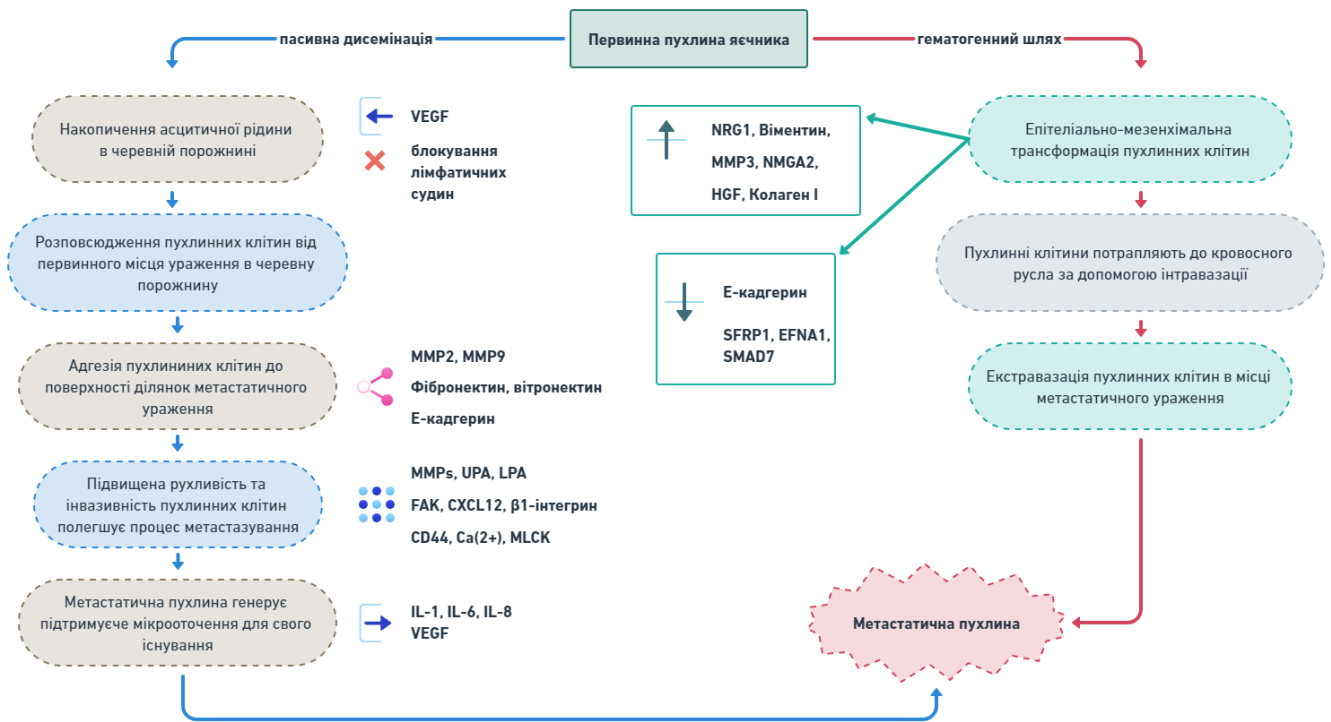


Рисунок 1.3.1. Схеми метастазування злоякісних новоутворень яєчників.

Відомо, що найбільш поширеним місцем метастазування РЯ є сальник з частотою виникнення 80 % [139]. Метастазування в сальник відбувається через трансцеломічний та гематогенний шляхи [140]. Існують думки, що неопластичні клітини яєчників переважно локалізуються в сальнику за рахунок відсутності базальної мембрани та невеликої кількості мезотеліальних клітин, що в свою чергу значно полегшує інвазію ракових клітин [141]. Безпосередня участь сальника в дренажі рідини з черевної порожнини, цим самим пасивно збільшуючи ймовірність прикріплення неопластичних клітин [142].

Важливо зауважити, що ключову роль в трансцеломічному (наприклад, перитонеальна дисемінація) поширенні раку яєчників відіграють пухлинно-асоційовані макрофаги (ПАМ), цим самим підтримуючи виживання клітин та інвазивність процесу. ПАМ є компонентною складовою сфероїдів раку яєчників, які і забезпечують формування метастазів. Крім того, було встановлено, що ПАМ всередині даних сфероїдів секретують EGF

(реальний фактор росту), які забезпечують активацію регуляції сигналів EGFR та VEGF [141, 143].

Etzerodt та співавт. на основі проведених досліджень, встановили, що сальник є премеастатичною нішею для розвитку інвазивного раку яєчників. Оскільки, тканина сальника містить специфічну підмножину тканинно-резидентних макрофагів, які експресують CD163 та Tim4, які є складовою метастатичного поширення [143]. Krishnan та співавт. демонструють результати досліджень, які свідчать про те, що сальникові макрофаги сприяють міграції та колонізації клітин раку яєчників до сальника за рахунок секреції хемокінових лігандів, які взаємодіють з хемокіновим рецептором 1 (CCR1) [144]. Також, відомо, про залучення цитокінів в метастатичний процес від раку яєчників до сальника. А саме, виділено ряд цитокінів, які найбільше виділяються сальниковими адипоцитами, до них відносять: інтерлейкін 6 (IL-6), інтерлейкін 8 (IL-8), моноцитарний хемоаттрактантний білок-1 (MCP-1), тканинний інгібітор металопротеїназ-1 (TIMP-1) та адипонектин. Активуючи клітини SKOV та стимулюючи їх міграцію [145]. Слід зазначити, що сальникові та перитонеальні адипоцити шляхом прямої взаємодії можуть передавати жирні кислоти до клітин раку яєчників, це в свою чергу призводить до зміни внутрішньоклітинної метаболічної активності в пухлинних клітинах та швидкого метастатичного їх росту шляхом генерації енергії за рахунок  $\beta$ -окислення [146].

Встановлено, що епітеліальний рак яєчників також може метастазувати до центральної нервової системи. Частота виявлення даного метастазування становить менше 2 % всіх випадків. Було припущено, що пухлинні клітини досягають головного та спинного мозку за рахунок їх здатності проникнення через судинний бар'єр, паренхіму та / або поширюватись вздовж периневрію від черепних або спинномозкових нервів [147].

Також, в літературі описано випадки метастазування раку яєчників в молочну залозу та / або пахвові лімфатичні вузли. Дана локалізація метастазування є доволі рідкісним явищем і становить лише 0.03 – 0.6 % усіх випадків. Метастазування раку яєчників до пахвової ділянки відбувається лімфатичним шляхом, включаючи грудну протоку та ліві надключичні вузли, що збільшує також ризик поширення пухлинного процесу саме до лівої молочної залози [19, 120].

**Матеріали даного розділу висвітлені в наступних публікаціях: [148-150].**

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Дисертаційна робота виконана в Сумському державному університеті на базі кафедри патологічної анатомії Навчально-наукового медичного інституту.

**Протокол комісії етики.** Проведення дослідження було схвалене етичним комітетом Навчально-наукового медичного інституту СумДУ (протокол № 1/12, 08.12.2022 р.). Усі дослідження виконані згідно з Гельсинською декларацією (6-те видання, перегляд 2008 р., Сеул) та Універсальною декларацією біоетики та прав людини (2006 р.).

#### ***Зразки пухлинної тканини раку яєчників***

Всі випадки раку яєчників були дослідженні клінічно, інструментально (ультразвукова діагностика) та морфологічно (представлені хірургічним матеріалом після оваріоектомії та пангістероктомії). Всім хворим було проведено хірургічне лікування в гінекологічних відділеннях Сумської міської клінічної лікарні №1 та Сумського обласного клінічного онкологічного центру.

Для дослідження було вивчено 266 препаратів пухлинної тканини злоякісних новоутворень яєчників. Матеріал був представлений післяопераційними зразками. При цьому, було встановлено, що прояви патологічної біомінералізації спостерігалися у 19.54 % досліджених зразків, які всі були представлені серозними аденокарциномами. Для дослідження було відібрано 60 зразків пухлинної тканини: 30 зразків РЯ з ознаками біомінералізації (І група) та 30 зразків РЯ без ознак біомінералізації (ІІ група). Проаналізувавши клінічні дані, ми мали можливість встановити та розподілити досліджувані випадки за класифікацією TNM. Також, це дозволило оцінити ступінь місцевого поширення пухлинного процесу, до регіонарних лімфатичних вузлів та розвитку віддалених метастазів. Було проведено аналіз результатів ультразвукової діагностики та патоморфологічних заключень.

#### ***Виявлення патологічних біомінералів***

Кальцифікати діаметром більше 0.5 мм виявлялися під час макроскопічної діагностики зразків пухлинної тканини. Патологічні

біомінеральні утворення діаметром менше 0.5 мм досліджувалися за допомогою гістологічного дослідження та скануючої електронної мікроскопії з гістологічних зрізів пухлинної тканини.

### ***Ультразвукове дослідження***

Ультразвукове діагностичне дослідження жінок з захворюваннями яєчників проводилася за допомогою апарату Toshiba Aplio MX з лінійним мультимодальним датчиком 6-12 МГц (Японія) на базі приватної клініки «Флоріс-С».

### ***Гістологічне та гістохімічне дослідження***

Матеріал тканини пухлин яєчників фіксували у нейтральному (забуференому) 4% розчині формальдегіду протягом 24 годин. Після зневоднення та насичення парафіном виготовляли гістологічні блоки. Серійні зрізи товщиною 4 мкм були зроблені за допомогою роторного мікротома Shandon Finesse 325 (Thermo Scientific). Після депарафінізації та дегідратації (ксилол та етанол), гістологічні зрізи забарвлювали гематоксином та еозином.

Для визначення відкладення кальцію гістологічні зрізи пухлинної тканини обробляли 5% водним розчином нітрату срібла (метод фон Косса) під прямим світлом лампи 60 Вт протягом 60 хвилин. Потім зразки тканини обробляли тіосульфатом натрію (5% водним розчином). Ядра забарвлювали водним розчином швидкого ядерного червоного швидкого протягом 5 хвилин (1:1000). Також, проводили PAS-реакцію та фарбування алізариним червоним S (модифікація Даля–Мак Гі).

Було проведено забарвлення зрізів за методом Ван-Гізона з використанням пікрофуксину (суміш кислого фуксину та пікринової кислоти). В якості основного барвника було використано залізний гематоксилін Вейгерта.

Під час мікроскопічного дослідження враховували наступні характеристики раку яєчників: гістологічний тип будови (згідно з класифікацією ВООЗ), тип кальцифікації, наявність метастазів.

### ***Імуногістохімічне дослідження***

Депарафінові зрізи піддавали температурному демаскуванню антигену в 0.1 М цитратному буфері (pH 6.0) при температурі 95 – 98 °C (Thermo Scientific, USA). Проведення та візуалізація імуногістохімічної реакції проводилася за допомогою системи детекції «Ultra Vision Quanto Detection System HRP Polymer» (Thermo Scientific, USA) та «DAB Quanto Detection System» (Thermo Scientific, USA). В якості первинних антитіл використовувалась наступна панель: OPN (*Anti-Osteopontin antibody, ab 37807*, Abcam, Cambridge, Велика Британія, розведення 1:300), OPG (*Anti-Osteoprotegerin antibody, ab 203061*, Abcam, Cambridge, Велика Британія, розведення 1:300), SPARC (*Anti-SPARC antibody, ab 203284*, Abcam, Cambridge, Велика Британія, розведення 1:300), RANKL (*Anti-RANKL antibody, ab 239607*, Abcam, Cambridge, Велика Британія, розведення 1:100), OC (*Anti-Amyloid Fibrils, ab228*, Merck, Германія), Casp3 (*Anti-Cleaved Caspase-3 antibody, ab 32042*, Abcam, Cambridge, Велика Британія, розведення 1:250), CD163 (*Clone EP 324*, Vitro Master Diagnostica, Іспанія), CD68 (*Clone 123 C3*, Vitro Master Diagnostica, Іспанія).

Ядра були контрастовані гематоксиліном Майєра. Також, було використано активний (тканини із заздалегідь отриманими позитивними та негативними реакціями) та пасивний (внутрішній) контроль ІГХ.

### ***Флюоресцентна мікроскопія***

Були використані такі первинні антитіла: CD 68 (*Clone KP1*, Thermo Scientific, USA, розведення 1:300), OPN (*ab 8448*, Abcam, Cambridge, Велика Британія, розведення 1:300), Col I (*Clone COL-1*, Thermo Scientific, USA, розведення 1:400). В комбінації I: CD68 (Mouse) + OPN (Rabbit) та II: CD68 (Mouse) + Col I (Rabbit). Були використані вторинні антитіла Alexa Fluor 568 (10 µg/mL, A11011, A11004 та A11079, Invitrogen, Burlington, USA) розведені в 10 % козячій та кролячій сироватці. Ядра контрастовані за допомогою DAPI. Флюоресцентні зображення отримані з використанням мікроскопу Carl Zeiss (Axio Imager A1).

### ***Морфометрія***

Оцінка морфометричних даних проведена за допомогою програмного забезпечення «Panoramic Viewer» (3D Histech, Угорщина) та «Zen 2.0» (Carl Zeiss, Німеччина). Позитивну реакцію клітин підраховували в полі зору 1000 мкм. Проаналізовано не менш ніж 6 полів кожного зразка.

Фотографії отримані за допомогою цифрової системи візуалізації «Zen 2.0» (Carl Zeiss, Німеччина) та «Panoramic Viewer» (3D Histech, Угорщина) + SEO Scan Lab 2.0

### ***Сканувальна електронна мікроскопія з EDX***

Із підготованого парафінового блоку тканини виготовляли гістологічні зрізи товщиною 10-12 мкм, які розміщували на предметному столику із спектрально чистого графіту. Зрізи витримували в термостаті при температурі 60°C упродовж 30 хв. Потім проводили депарафінацію гістологічних зрізів за допомогою ксилолута етилового спирту. Виготовлені препарати досліджували на скануючому мікроскопі SEO-SEM Inspect S50-B (Україна) з енергодисперсійним спектрометром AZtecOne з детектором X-Max N 20 (Oxford Instruments plc, Abingdon, UK). Обробка EDX спектрів виконувалась штатним програмним забезпеченням системи мікроаналізу.

### ***Рентгенівська дифракція***

Рентгенівська дифракція біомінералів була проведена дифрактометром ДРОН-4-07 («Буревісник»). Обробка експериментальних результатів проведена в програмному пакеті DIFWIN-1 (ТОО «Еталон-ПТЦ»), ідентифікація фазового складу проводилась за допомогою картотеки JCPDS (Join Committee on Powder Diffraction Standards).

### ***Просвічувальна електронна мікроскопія***

Просвічувальна електронна мікроскопія (ПЕМ) електронною дифракцією (ЕД) проведена на мікроскопі ПЕМ-125К (SELMІ, Україна). Мінералізовану тканину у вигляді порошку обробляли ультразвуком у дистильованій воді установкою УЗДН-А (SELMІ, Україна). Питома потужність установки 15 – 20 Вт/см<sup>2</sup> при частоті випромінювача 22 кГц. Отриману суспензію (декілька

крапель) наносили на вертикально направлений догори ультразвуковий випромінювач УЗДН-А і розпорошували протягом 2-3 секунд, змінюючи потужність установки. Розпилений аерозоль вловлювали на тонку вуглецеву плівку (10-20 нм), розташовану на мідній сітці тримача зразків. Картини ЕД та мікрофотографії були отримані при напрузі  $U_{\text{приск}} = 90$  кВ.

### ***Хімічний аналіз***

Кальцифікати пухлин яєчників зважували на аналітичних вагах ВЛА з точністю до 1 мг. Після цього спалювали в порцелянових тиглях у муфельній печі при температурі 450 °С протягом 48 годин. Попіл, який отримували розчиняли в 10% соляній та азотній кислотах. Доводили бідистильованою водою до 10 мл. На атомному абсорційному спектрофотометрі С-115М1 визначали кількість цинку (довжина хвилі – 213.9 нм), заліза (довжина хвилі – 248.3 нм), магнію (довжина хвилі – 520 нм) та міді (довжина хвилі – 324.7 нм). Для визначення вмісту Zn, Fe, Cu та Mg використовували атомізацію в полум'ї.

### ***Фізико-хімічні методи дослідження***

Вивчення біомінералів за допомогою методів прикладного матеріалознавства було проведено в лабораторії Інституту прикладної фізики НАН України (завідувач відділу радіаційної біофізики, кандидат фізико-математичних наук С.М. Данильченко).

Мінеральну складову макроскопічних кальцифікатів відокремлювали від м'яких тканин шляхом термічної обробки в електропечі при температурі 200 °С на протязі 1 години. Це сприяло руйнуванню органічної частини кальцифікату та видаленню залишків води, зберігаючи при цьому структуру кристаліту. Також проводилася обробка матеріалу при 900 °С протягом 1 години, це в свою чергу дозволяло повністю відокремити органічну та неогранічну складові частини біомінералів.

### ***Статистичний аналіз***

На основі даних Національного канцер-реєстру України. Сумського обласного канцер-реєстру та відділу статистики Сумського обласного клінічного онкологічного центру проведений аналіз захворюваності на



злякисні новоутворення яєчників серед жіночого населення України та Сумської області в період 2014–2021 років. За допомогою статистичних методів розраховано:  $X_c$  – середній показник захворюваності,  $\sigma$  – стандартне відхилення,  $Me$  – медіана,  $\mu$  – середня похибка.

Результати морфометричного та імуногістохімічного дослідження перевірені на нормальний розподіл за допомогою критерію Шапіро-Уїлка. Для оцінки статистичної значимості ненормального розподілу був використаний критерій Манна-Уїтні.

Вибірка даних, яка відповідала нормальному розподілу порівнювалась за допомогою параметричного t-критерію Стьюдента.

## РОЗДІЛ 3

### 3.1. ЕПІДЕМІОЛОГІЯ ЗЛОЯКІСНИХ ПУХЛИН ЯЄЧНИКІВ У СУМСЬКІЙ ОБЛАСТІ ВПРОДОВЖ 2014 – 2021 рр.

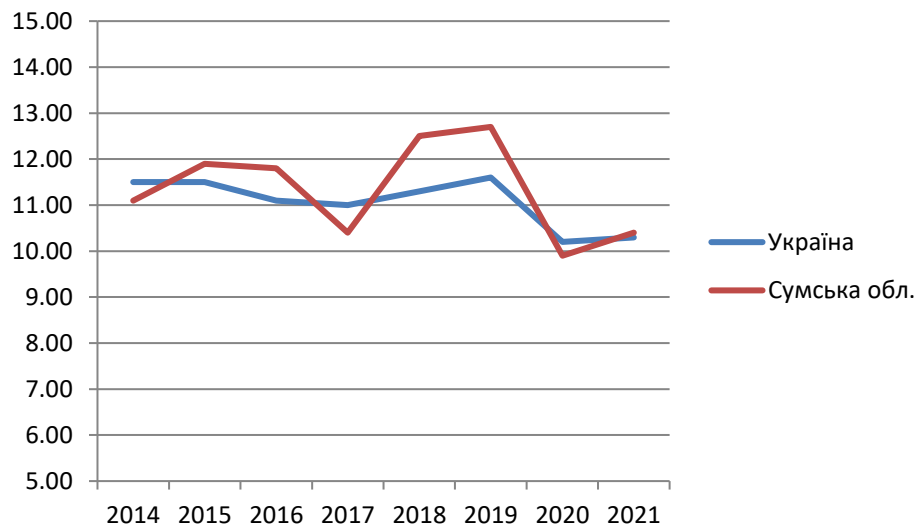
Для епідеміологічної оцінки злоякісних новоутворень яєчників проведено аналіз даних Національного канцер-реєстру України, Сумського обласного канцер-реєстру та статистичного відділу Сумського обласного клінічного онкологічного центру впродовж 2014–2021 років.

Аналіз статистичних даних демонструє, що впродовж 2014–2021 років було зареєстровано 27104 випадків раку яєчників (в середньому за рік –  $3388 \pm 59.02$ ). Загалом, середнє значення захворюваності за 2014–2021 роки сягає  $11.06 \pm 0.19$  випадків на 100 тис. жіночого населення.

Встановлено, що в Україні найвищий рівень захворюваності на злоякісні новоутворення яєчників спостерігаються в 2014–2015 та 2019 роках (11.5 та 11.6 випадків на 100 тис. жіночого населення відповідно). В той же час, найнижчий – в 2020 році (10.2 випадків на 100 тис. жіночого населення). Слід зазначити, що показники захворюваності у Сумській області дещо відрізняються, найвищого рівня даний показник сягав в 2019 році (12.7 випадків на 100 тис. жіночого населення). Крім того, найнижчий рівень спостерігався в 2020 році та сягав 9.9 випадків на 100 тис. жіночого населення, що повторює тенденцію зниження порівняно із загальнодержавним рівнем (рис. 3.1.1).

Насамперед, слід відмітити, що за період спостереження (2014–2021 рр.) показники захворюваності на злоякісні неоплазії яєчників у Сумській області значно перевищують загальнодержавний рівень, за винятком 2014, 2017 та 2020 років. В той же час, з 2016 року спостерігається тенденція до зниження захворюваності як в Сумській області, так і в Україні загалом. Крім того, в 2017 році показник захворюваності в порівнянні з 2016 роком знижується на 11.8 % та 0.9 % в Сумській області та Україні відповідно. Однак, слід звернути увагу, що рівень захворюваності в 2018 році демонструє тенденцію до збільшення частоти випадків в порівнянні з 2017 роком, як в Сумській області, так і в Україні зростаючи при цьому на 20.1 % та 3.5 % відповідно. Дана тенденція до

зростання спостерігалась і в 2019 році із збільшенням показника захворюваності як в Україні, так і в Сумській області на 2.65 % та 1.6 % відповідно. Слід відмітити, що в 2020 році знову відбулось так зване коливання показників із зниженням рівня захворюваності в Україні на 12.07 % та в Сумській області на 22.05 %.



*Рисунок 3.1.1. Порівняння показників захворюваності на злоякісні новоутворення яєчників в Україні та Сумській області протягом 2014–2021 років. Вісь ординат – стандартизований показник (світовий стандарт) на 100 тис. жіночого населення, вісь абсцис – роки.*

За результатами вікового аналізу хворих на злоякісні неоплазії яєчників встановлено, що найвищі показники захворюваності відмічаються серед жінок у віці 60–79 років ( $34.37 \pm 0.59$ ). В той же час, досить високий рівень спостерігається у таких вікових діапазонах як 40–59 років ( $27.67 \pm 0.42$ ) та старше 80 років ( $13.77 \pm 0.71$ ), значно рідше – у 20–39 років ( $5.4 \pm 0.25$ ) та лише в поодиноких випадках до 19 років ( $0.84 \pm 0.09$ ) (рис. 3.1.2).

При проведенні аналізу розподілу гістологічних типів злоякісних новоутворень яєчників нами було досліджено архівні дані Сумського обласного клінічного онкологічного центру. Серед 266 випадків раку яєчників було виявлено, що 91 % від загальної кількості новоутворень складають поверхневі епітеліально-стромальні пухлини. Серед яких, 75 % становлять серозні аденокарциноми яєчників, незначну питому частку займають муцинозні та

ендометріюїдні злоякісні неоплазії яєчників, складаючи при цьому 12 % та 4 % відповідно. Крім того, слід враховувати, що значно рідше зустрічаються випадки гормонпродукуючих та герміногенних злоякісних новоутворень яєчників, питома частка яких в сумі складає лише 9 % від загальної кількості новоутворень яєчників яєчників (рис. 3.1.3).

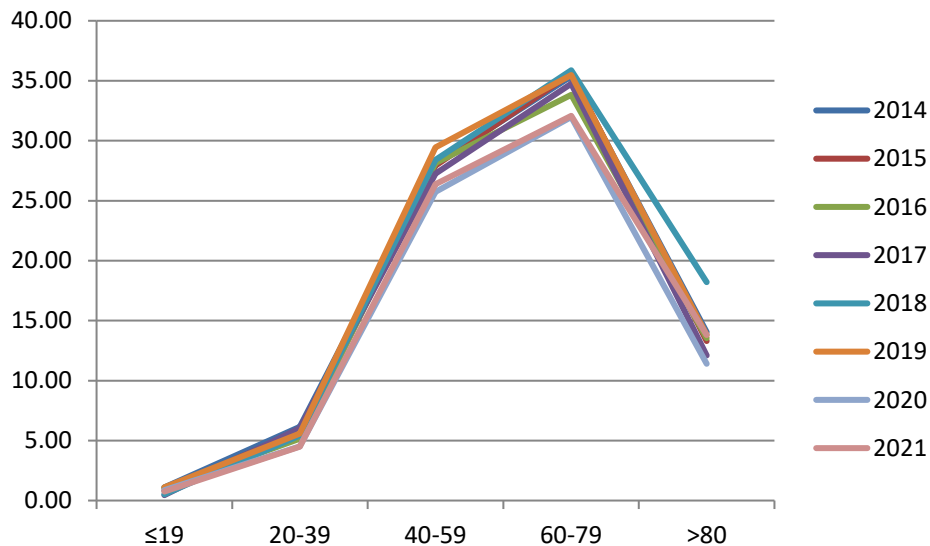


Рисунок 3.1.2. Розподіл пацієнтів за віковими періодами на злоякісні новоутворення яєчників протягом 2014–2021 років. Вісь ординат – середній віковий показник, вісь абсцис – вікові періоди.

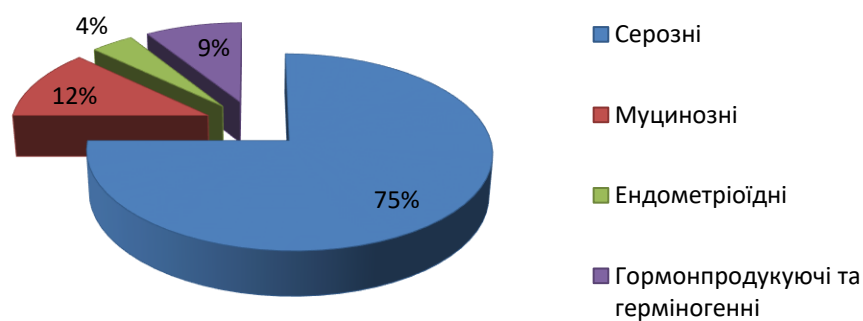
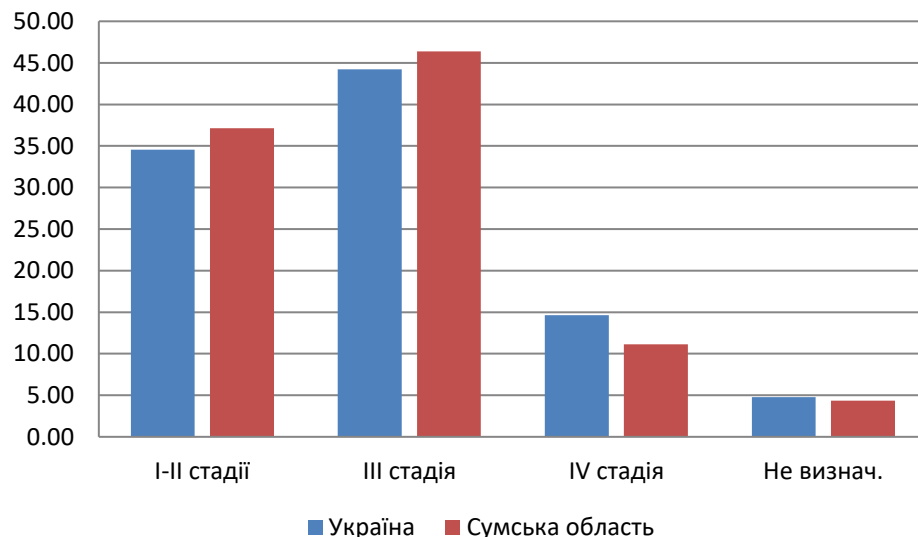


Рисунок 3.1.3. Порівняння питокої частки різних гістологічних типів злоякісних новоутворень яєчників. Поверхневі епітеліально-стромальні злоякісні пухлини – серозний, муцинозний та ендометріюїдний гістологічний тип. Інші – гормонпродукуючі та герміногенні злоякісні неоплазії.

На основі проведеного аналізу щодо стадійності пухлинного процесу злоякісних неоплазій яєчників в Сумській області було встановлено, що у 47 % рак яєчників діагностовано саме на III стадії захворювання, у 36 % – I–II стадія, у 12 % – IV стадія та у 5 % – стадію не визначено (рис. 3.1.4).

Насамперед, слід зазначити, що вдосконалення та розширення діагностичних можливостей, в першу чергу, знаходять своє відображення в значному зростанні рівня захворюваності на злоякісні новоутворення яєчників в Сумській області. Вагомий внесок у виявлення хворих внесли запровадження імуногістохімічного дослідження пухлин яєчників та зростання кількості сучасних апаратів ультразвукової діагностики та комп'ютерної томографії.



*Рисунок 3.1.4. Порівняння показників стадійності пухлинного процесу з числа вперше виявлених злоякісних новоутворення яєчників в Україні та Сумській області.*

**Матеріали даного розділу висвітлені в наступних публікаціях: [151].**

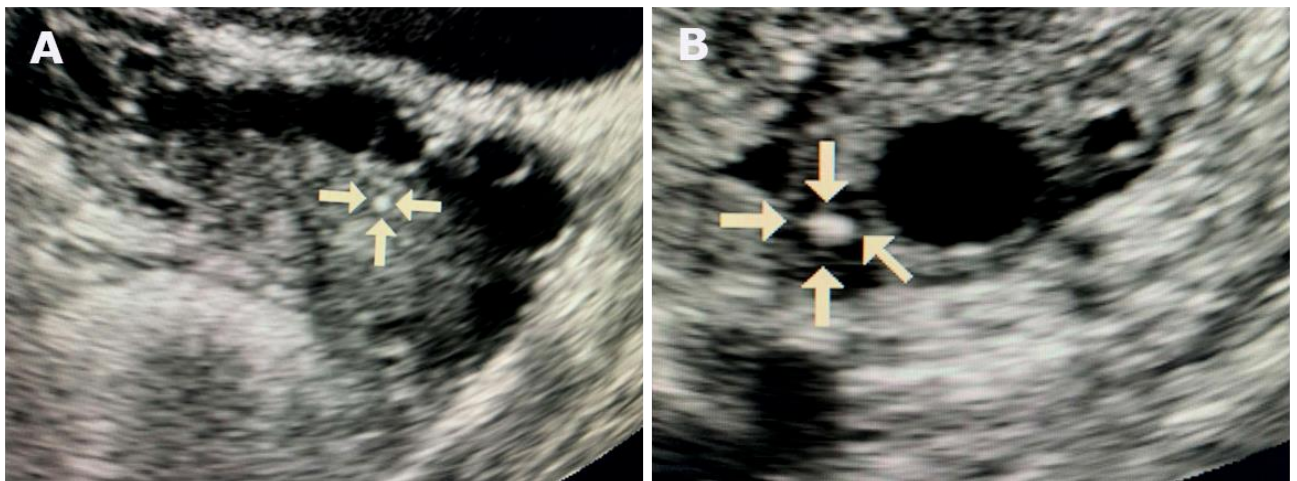
## РОЗДІЛ 4

### ДОСЛІДЖЕННЯ ТКАНИНИ ЗЛОЯКІСНИХ НОВОУТВОРЕНЬ ЯЄЧНИКІВ З ОЗНАКАМИ БІОМІНЕРАЛІЗАЦІЇ

#### 4.1. Ультразвукове дослідження злоякісних новоутворень яєчників з біомінеральними включеннями

При ультразвуковій діагностиці тканина яєчника була представлена у вигляді неправильних мультилокулярних солідних пухлин з сильним кровотоком при доплерографії. Візуалізувалось більше трьох папілярних структур, висота найбільшої з них сягала  $> 16$  мм, зовнішні контури гладкі, акустичні тіні відсутні. У деяких випадках були наявні анехогенні простори (мікрокісти) всередині папілярних структур. Візуалізувалось злиття 1 і більше папілярних структур. Папілярний кут, тобто між сосочком та внутрішньою стінкою кісти був класифікований як тупий ( $\geq 90^\circ$ ).

Було виявлено поодинокі гіперехогенні утворення округлої форми з гладенькими краями та чіткими контурами, однорідні за ехоструктурою та з відсутністю акустичних тіней. Дані утворення сягали розміру від 2 до 5 мм та характеризувались аваскулярним типом судинного рисунка в оточуючих тканинах (рис. 4.1.1. А, В).

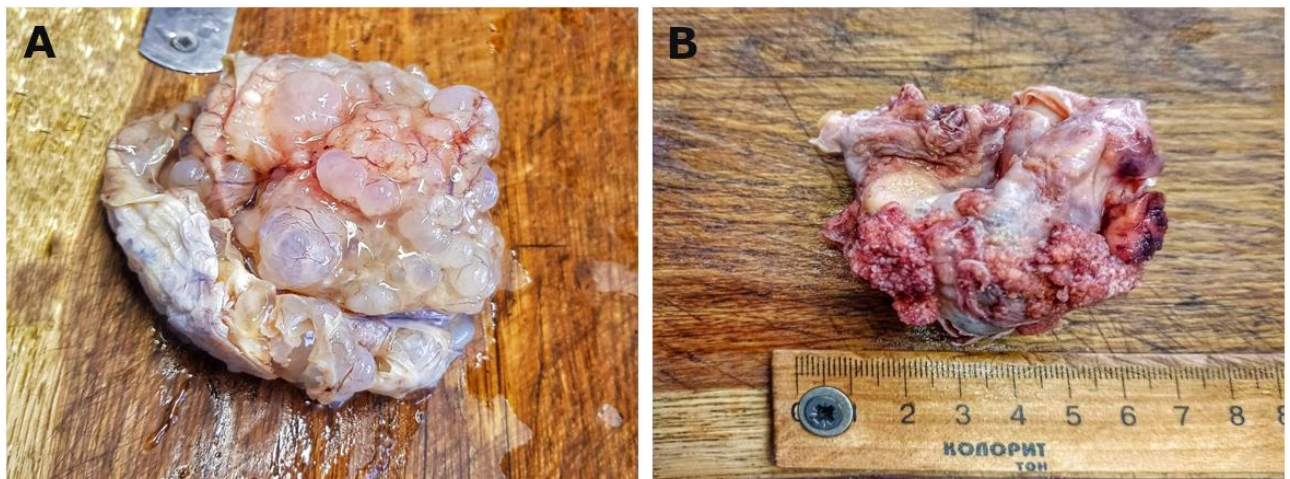


*Рисунок 4.1.1. Ультразвукова діагностика пухлини яєчника з патологічними біомінералами (позначено стрілками). А – біомінеральне утворення тканини раку яєчника; В — біомінеральне утворення оточенопухлинною тканиною з утворенням кісти.*

#### 4.2. Макроскопічне дослідження злоякісних новоутворень яєчників

Для дисертаційної роботи було відібрано 30 зразків злоякісних новоутворень яєчників з ознаками біомінералізації. Остаточне підтвердження відібраних зразків відбувалось з використанням гістологічних та гістохімічних методів дослідження. Середній вік пацієток даної групи складав  $55.41 \pm 1.86$  років.

Макроскопічна будова пухлин яєчників представлена у вигляді одно- та багатокамерних кістозних утворень, які повністю заміщували тканину яєчника. Вони мали сферичну (яйцеподібну) форму та були виповнені рідким прозорим вмістом. Товщина стінки кісти варіювала від 1 до 4 мм, помірної щільності та в деяких випадках з щільними (кістковими включеннями) (рис. 4.2.1.А ). По зовнішній та внутрішній поверхні стінки кісти візуалізувались папілярні розростання розміром від 1 до 20 мм. Вони були представлені у вигляді поодиноких утворень або повністю заповнювали просвіт кістозного утворення (рис. 4.2.1. В). Папілярні розростання мали рихлу структуру та легко руйнувались при дотиканні, однак зустрічались і доволі щільної консистенції. У деяких випадках матеріал був представлений у вигляді конгломерату, щільно спаяного з органами малого тазу.



*Рисунок 4.2.1. Макроскопічне дослідження пухлини яєчника. А – кістозне утворення з папілярними розростаннями по внутрішній поверхні стінки кісти. В – кістозне утворення з папілярними розростаннями по зовнішній поверхні стінки кісти.*

Діаметр пухлинних утворень в даній групі варіював від 2 до 25 мм з середнім показником  $10 \pm 1.09$  мм.

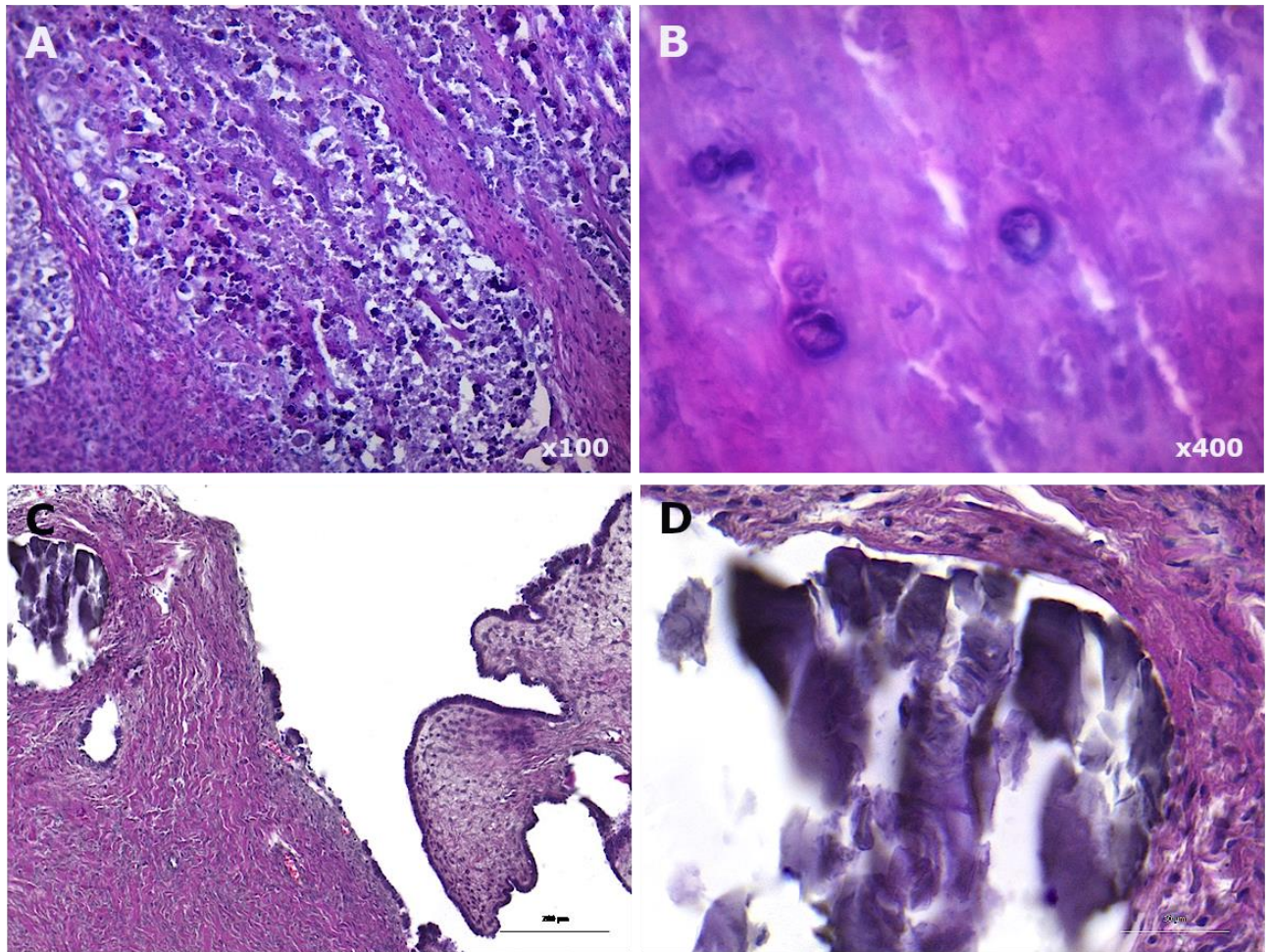
### **4.3. Гістологічне дослідження злоякісних новоутворень яєчників з біомінеральними включеннями**

Тканина серозної карциноми яєчників гістологічно характеризувались мікро- та макропапілярними розростаннями, поодинокими клітинами та хаотично сформованими невеликими гніздами клітин з інфільтрацією стромы. Клітини пухлини були мономорфними, невеликого розміру, мали помірну атипію ядер та виражене ядерце. Окремі зразки серозних карцином були представлені солідними масами з щілиноподібними просвітами, пухлинні клітини з великими, гіперхромними, плеоморфними ядрами химерної конфігурації. Спостерігалось формування псевдососочків, аркад, залозистоподібних та криброзних структур. У пухлинній тканині також траплялися багатоядерні клітини з еозинофільними ядерцями, циліндричні клітини з округлими та овальними ядрами, високі з витягнутим гіперхромним ядром та слабо вираженою цитоплазмою. Значно виражений клітинний і ядерний поліморфізм. Хроматин в ядрах пухлинних клітин розподілений нерівномірно. Некротичні зміни були відсутні.

Аналіз зображень гістологічного дослідження демонстрували наявність патологічних біомінералів у вигляді псаммомних тілець (ПТ) у пухлинній тканині яєчника з варіацією кількості від 1 до 200 одиниць. ПТ переважно локалізувались у основі папілярних розростань серозної карциноми яєчників та детриті пухлинної тканини. Значна кількість ПТ знаходилася у товщі сполучної тканини пухлинних вузлів, а також прилеглої інтактної тканини яєчників. Виявлялись як у вигляді поодиноких утворень, так і скупчень, а також рівномірного «висіювання» по всій пухлинній тканині. Навколо ПТ виявлялись залишки судинних стінок капілярів. ПТ були представлені концентричними кальцифікованими структурами та їх уламками неправильної форми. Уламки утворювались за рахунок механічного пошкодження мікротомним ножом під



час проведення етапів гістотехнічного приготування мікропрепаратів. Також виявлялися точкові мінеральні депозити поліморфної будови (рис. 4.3.1. А–D).

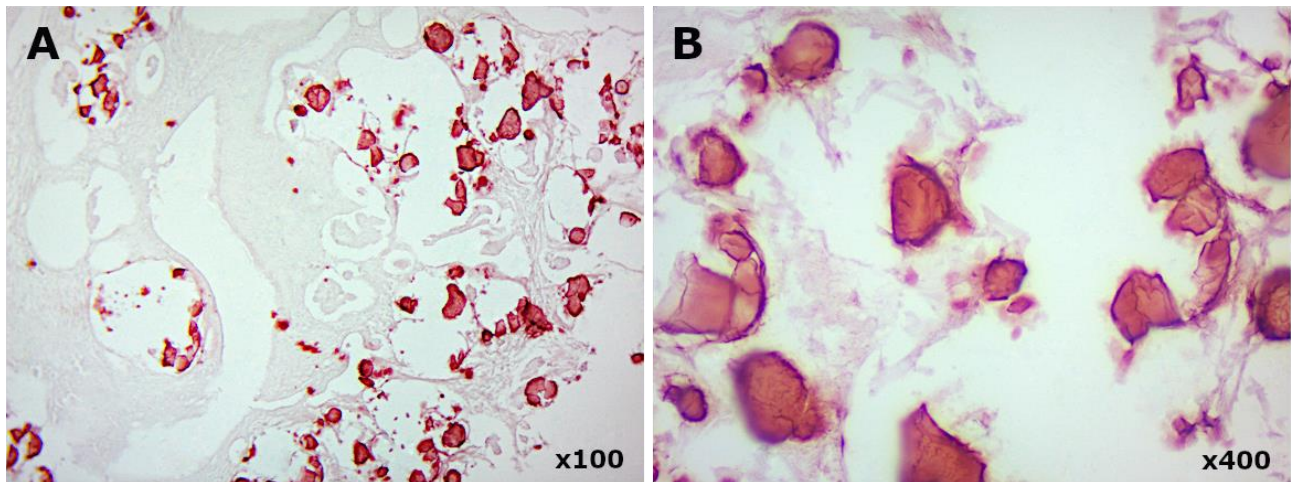


*Рисунок 4.3.1. Гістологічне дослідження злоякісних новоутворень з патологічними біомінералами (група I). Забарвлення гематоксиліном та еозином. В правому нижньому куті вказано збільшення кожного зображення.*

#### **4.4. Гістохімічне дослідження злоякісних новоутворень яєчників з біомінеральними включеннями**

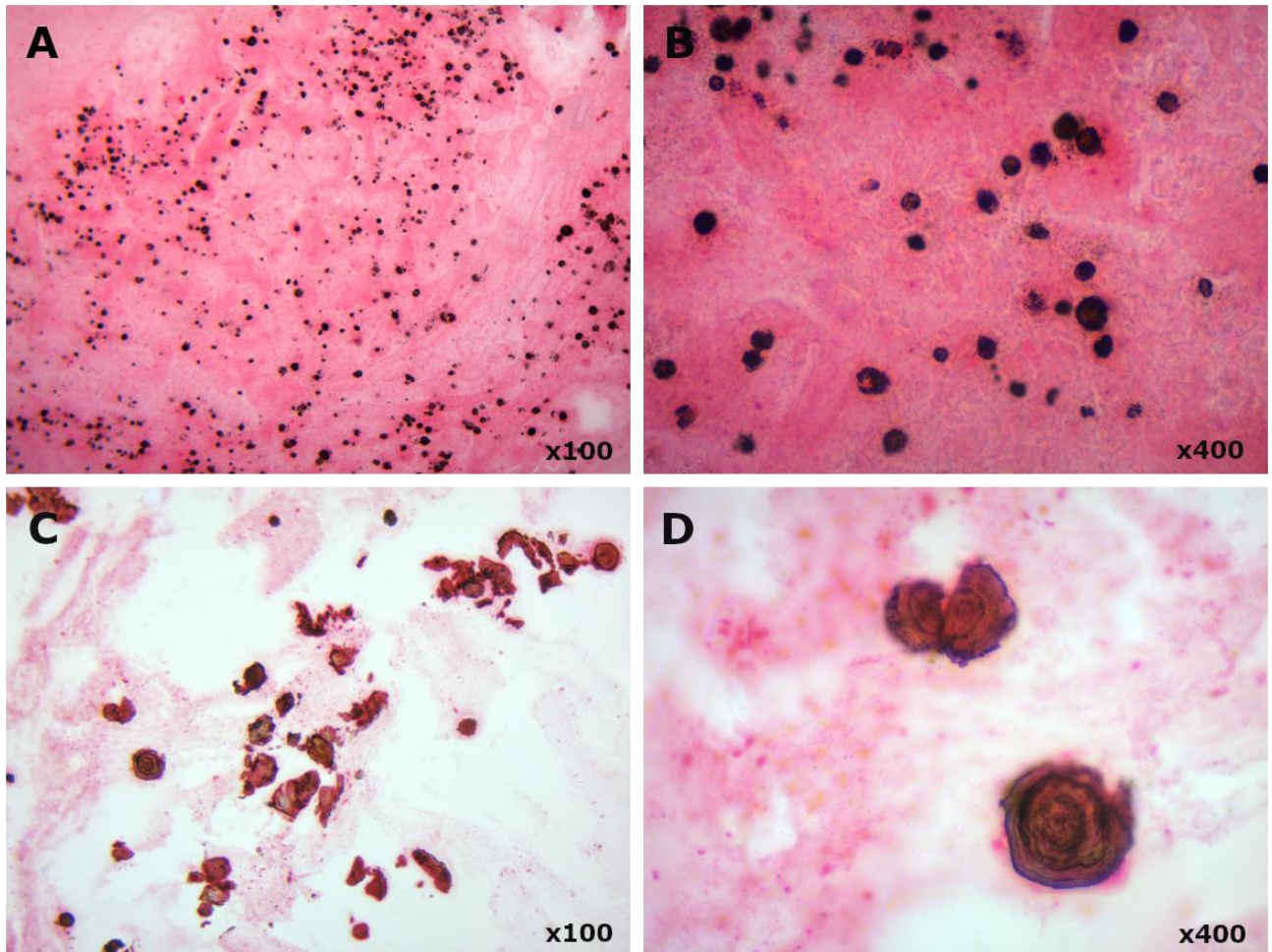
Забарвлення алізариновим червоним S зразків раку яєчників з біомінералізацією проведено для виявлення сполук кальцію. Дана методика допомогла візуалізувати кальцифікуючі депозити у стромі пухлинної тканини та папілярних розростаннях, що аналогічно забарвленню за фон Коссом. Біомінеральні утворення забарвлювались у відтінки червоного кольору, з градацією від класично червоного до насичено вишневого. Відмічалалась так

звана відмінність накопичення барвника, оболонка біомінеральних депозитів мала більшу насиченість кольору порівняно із ядром. В той же час, накопичення барвника ядром було із більш вираженою прозорістю (здатністю до просвічування), що характеризується меншою щільністю (рис. 4.4.1. А, В).



*Рисунок 4.4.1. Гістохімічне дослідження злжкісних новоутвореньяєчників з патологічними біомінералами (група I). Забарвлення алізариновим червоним S. В правому нижньому куті вказано збільшення кожного зображення.*

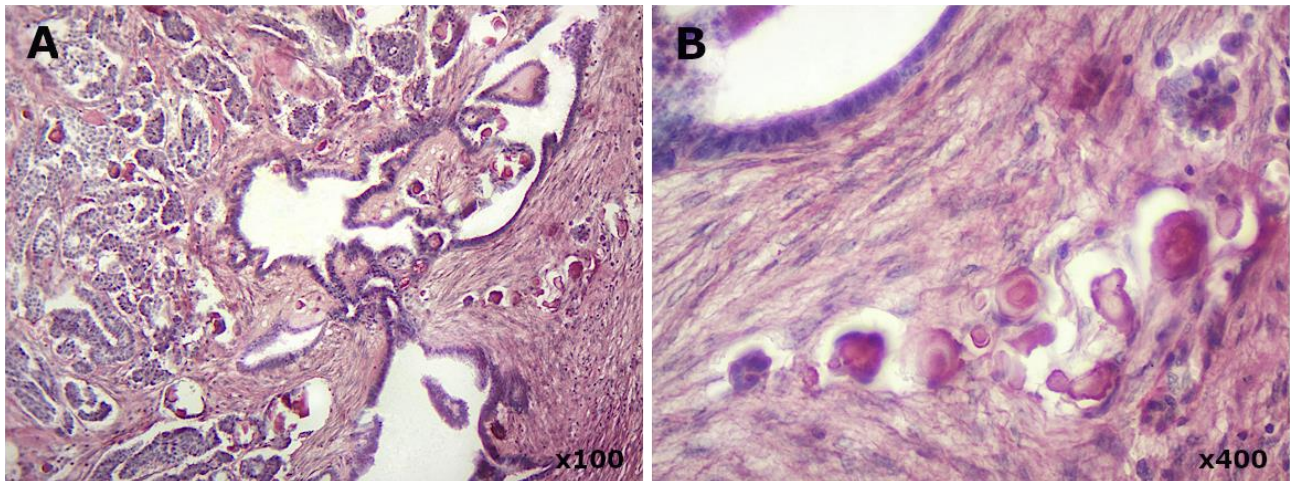
Препарати злжкісних новоутворень яєчників з біомінералізацією (група I) забарвлювались за фон Коссом для виявлення солей кальцію фосфату. Біомінеральні утворення та їх фрагменти у пухлинній тканині забарвлювались в коричневий, темно-бурий та чорний колір. Вони мали округлу та сферичну форму, різний розмір. Локалізувались як у папілярних утвореннях, так і стромі пухлинної тканини у вигляді поодиноких утворень, скупчень та рівномірно розподілялися по всій поверхні досліджуваного препарату. Візуалізувалась відмінність насиченості забарвлення між ядром та оболонкою утворення (рис. 4.4.2. А, В). Також, відмічалась різниця в накопиченні барвника структурними елементами ПТ. Ламели ПТ мали більшу насиченість забарвлення порівняно з пластинчастим шаром, це може свідчити про неоднорідність їх структури та щільності (рис. 4.4.2. С, D).



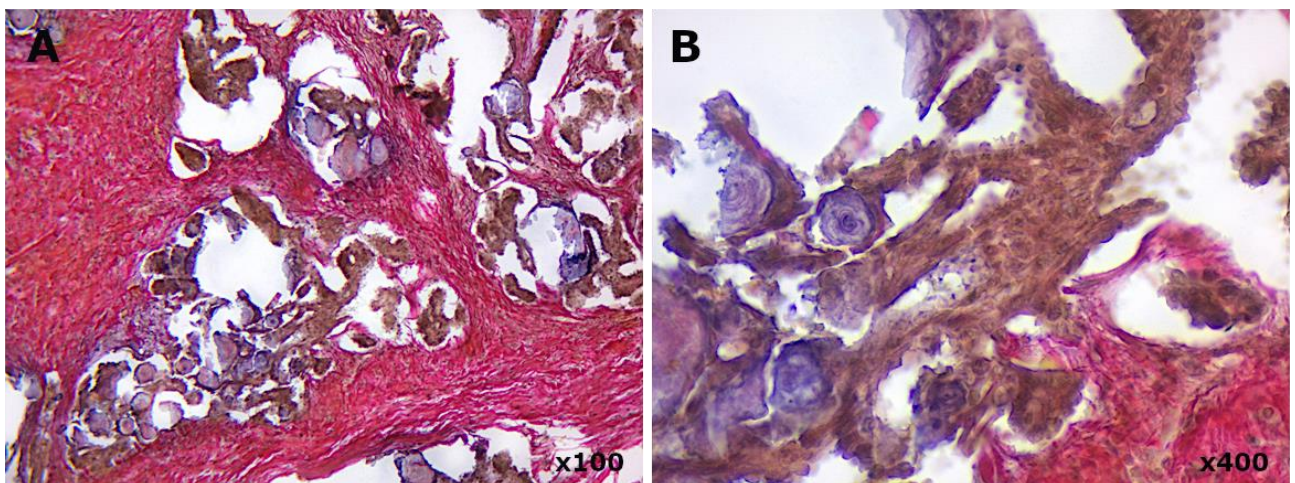
*Рисунок 4.4.2. Гістохімічне дослідження злоякісних новоутворень яєчників з патологічними біомінералами (група I). Забарвлення за фон Коссом. В правому нижньому куті вказано збільшення кожного зображення.*

Також, було застосовано PAS-реакцію для виявлення присутності глікопротеїнів, фосфоліпідів та глікозаміногліканів у зразках тканини раку яєчників з біомінералізацією. Візуалізувалось накопичення барвника в біомінеральних утвореннях з більшою інтенсивністю в ядрі та зовнішніх ламелах (рис. 4.4.3. А, В).

Забарвлення за методом Ван-Гісона дозволяє візуалізувати сполучну тканину та колагенові волокна, забарвлюючи їх у яскраво-червоний колір. У біомінеральних утвореннях серозних карцином яєчників не спостерігається будь-якого накопичення барвника, на відмінну від стромального компоненту пухлинної тканини (рис. 4.4.4 А, В).



*Рисунок 4.4.3. Гістохімічне дослідження злоякісних новоутворень яєчників з патологічними біомінералами (група I). Забарвлення PAS-реакцією. В правому нижньому куті вказано збільшення кожного зображення.*

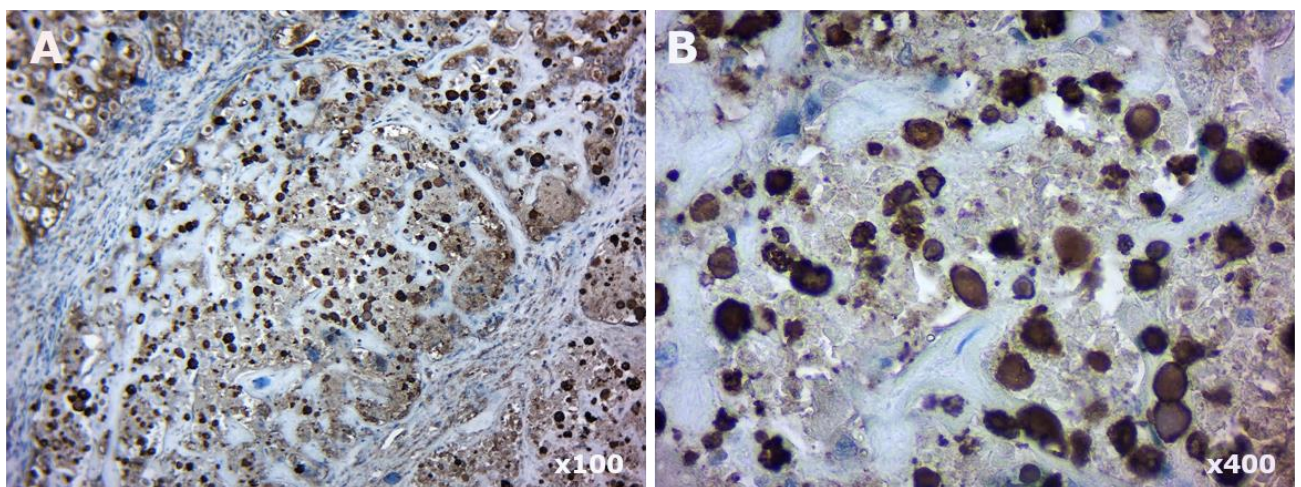


*Рисунок 4.4.4. Гістохімічне дослідження злоякісних новоутворень яєчників з патологічними біомінералами (група I). Забарвлення за методом Ван-Гізона. В правому нижньому куті вказано збільшення кожного зображення.*

#### **4.5. Імуногістохімічне дослідження злоякісних новоутворень яєчників з біомінеральними включеннями**

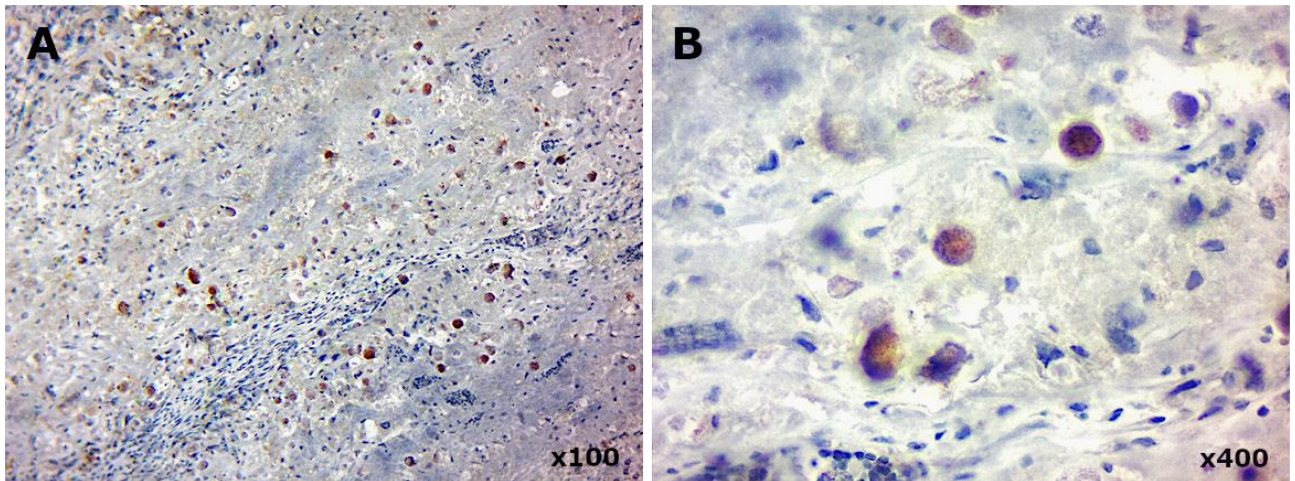
Для імуногістохімічного дослідження використовували наступну панель маркерів остеобластичного фенотипу, такі як OPN, OPG, RANKL та SPARC, а також панель маркерів макрофагів, таких як CD68 та CD163, додатково було використано маркер Casp-3 та OC (*Anti-Amyloid Fibrils*).

ІГХ тканини серозних карцином яєчника з антитілами проти OPN показало накопичення цього білка на поверхні біомінеральних утворень. Як правило, білок покриває поверхню кальцифікату, накопичуючись на краях утворення і між ламелами ПТ. Також спостерігається позитивна цитоплазматична реакція на OPN у клітинах пухлинного мікрооточення, переважно мононуклеарної та фібробластоподібної морфології. Експресія OPN у зразках раку яєчників з наявністю патологічної біомінералізації складала  $73.34 \pm 4.25$  клітин в полі зору діаметром 1 мм (рис. 4.5.1. А, В).



*Рисунок 4.5.1. Імуногістохімічне дослідження експресії OPN у тканині злоякісних новоутворень яєчників з патологічними біомінералами (група I). Ядра контрастовані гематоксилином Майєра. В правому нижньому куті вказано збільшення кожного зображення.*

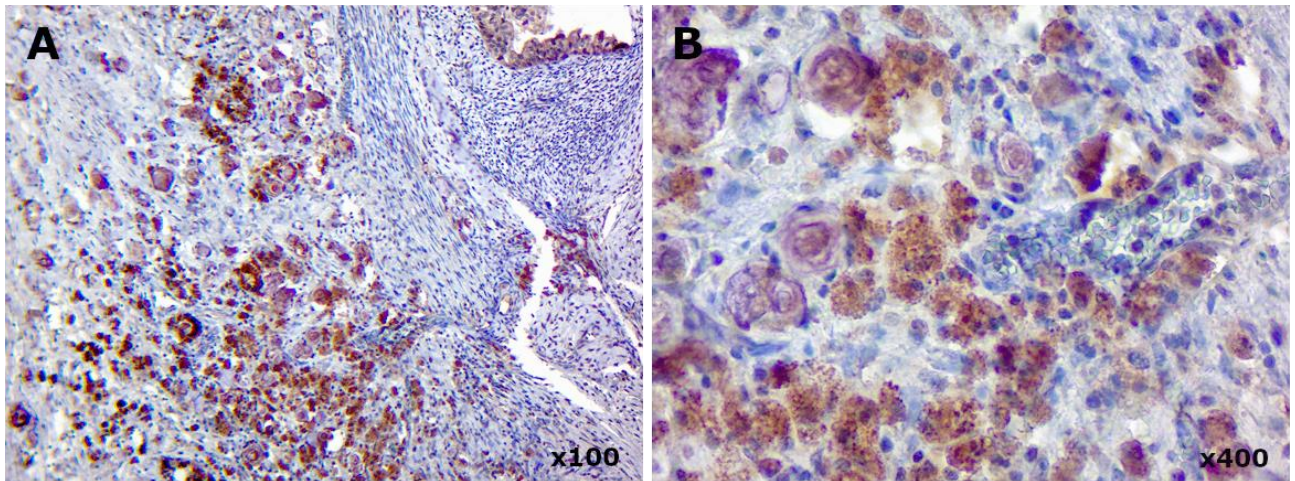
При ІГХ дослідженні з використанням антитіла проти ОС було встановлено накопичення даного білка у структурі патологічних біомінералів, а саме у міжпластинчастих шарах ПТ. З іншого боку, не виявлено позитивної реакції пухлинними клітинами, клітинами строми та пухлинного мікрооточення (рис. 4.5.2. А, В).



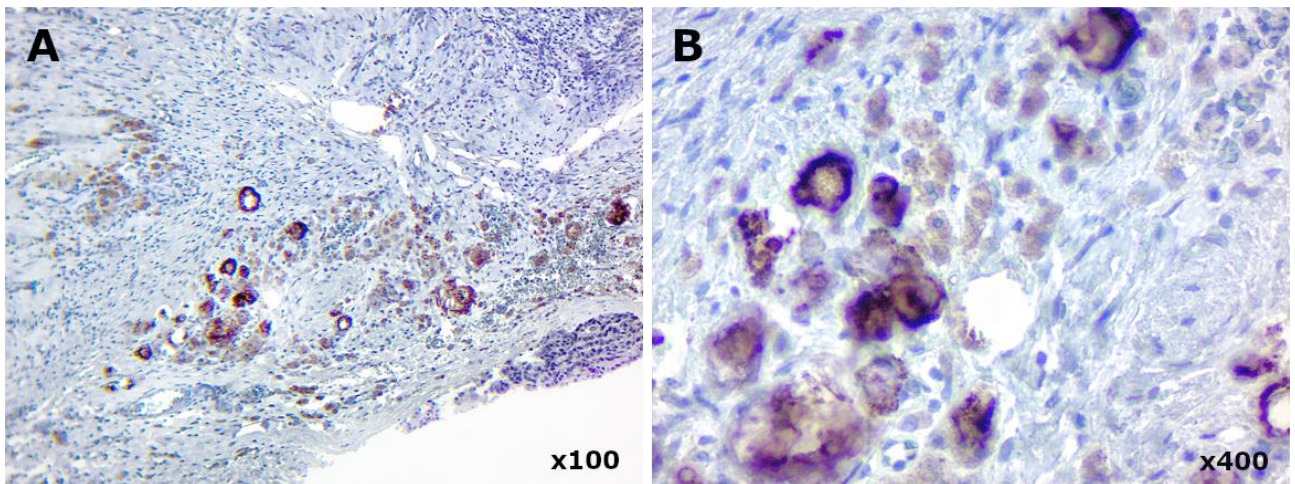
*Рисунок 4.5.2. Імуногістохімічне дослідження експресії ОС у тканині злоякісних новоутворень яєчників з патологічними біомінералами (група I). Ядра контрастовані гематоксилином Майєра. В правому нижньому куті вказано збільшення кожного зображення.*

Використання антитіла проти OPG при проведенні ІГХ дослідження продемонструвало цитоплазматичну експресію низької та помірної інтенсивності пухлинними клітинами. Візуалізувалась помірно виражена експресія OPG поодинокими клітинами пухлинного мікрооточення із позитивно забарвленими клітинами запального інфільтрату. Експресія OPG в тканині раку яєчників з патологічною біомінералізацією складала  $63.07 \pm 3.52$  клітин в полі зору діаметром 1 мм (рис. 4.5.3. А, В).

При ІГХ дослідженні з використанням антитіла проти RANKL встановлено низьку експресію пухлинними клітинами та клітинами пухлинного мікрооточення. Спостерігалась виражена та помірно виражена експресія клітинами запального інфільтрату та на периферії поодиноких біомінеральних утворень. Позитивна реакція встановлена у  $56.37 \pm 3.30$  клітин клітин в полі зору діаметром 1 мм (рис. 4.5.4. А, В).

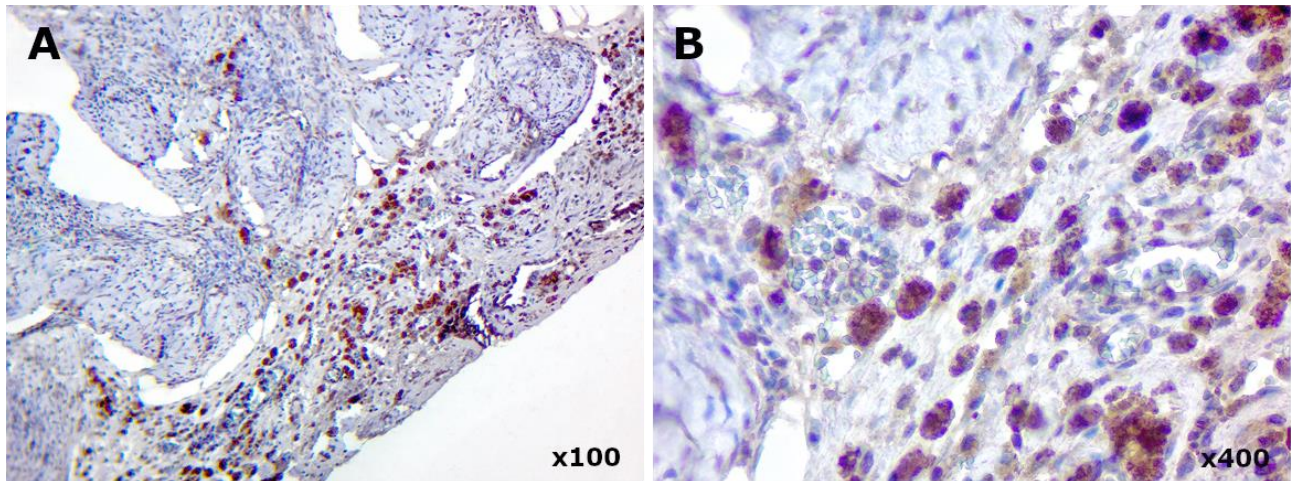


*Рисунок 4.5.3. Імуногістохімічне дослідження експресії OPG у тканині злоякісних новоутворень яєчників з патологічними біомінералами (група I). Ядра контрастовані гематоксилином Майєра. В правому нижньому куті вказано збільшення кожного зображення.*



*Рисунок 4.5.4. Імуногістохімічне дослідження експресії RANKL у тканині злоякісних новоутворень яєчників з патологічними біомінералами (група I). Ядра контрастовані гематоксилином Майєра. В правому нижньому куті вказано збільшення кожного зображення.*

Використання антитіл проти SPARC на зразках раку яєчників з патологічною біомінералізацією показало позитивну реакцію низької та помірної інтенсивності пухлинними клітинами. Встановлено помірно виражену експресію клітинами пухлинного мікрооточення, запального інфільтрату та строми. Не було виявлено будь-якого накопичення даного білка на поверхні біомінеральних утворень. Експресія в першій групі досліджуваних зразків складала  $63.19 \pm 3.39$  клітин в полі зору діаметром 1 мм (рис. 4.5.5. А, В).

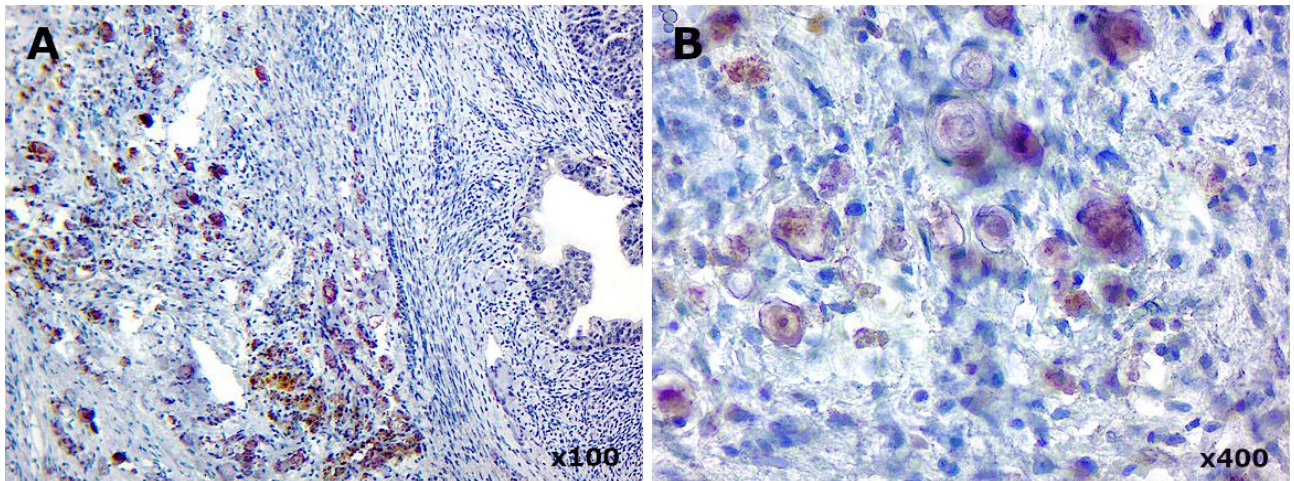


*Рисунок 4.5.5. Імуногістохімічне дослідження експресії SPARC у тканині злоякісних новоутворень яєчників з патологічними біомінералами (група I). Ядра контрастовані гематоксилином Майєра. В правому нижньому куті вказано збільшення кожного зображення.*

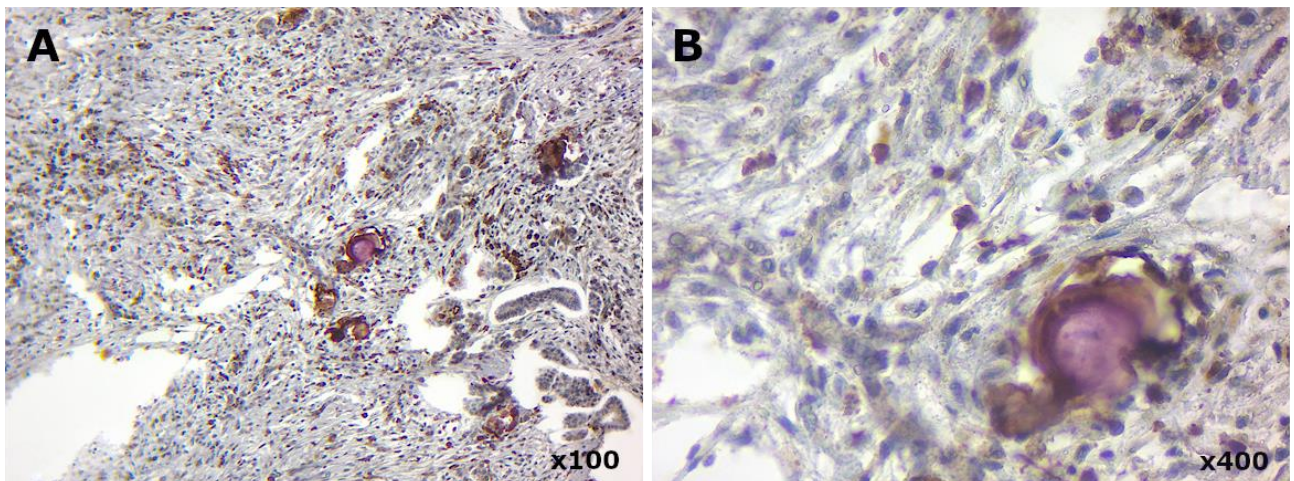
ПГХ дослідження зразків раку яєчників з патологічною біомінералізацією при використанні антитіла проти Casp3 встановлено виражену позитивну експресію в клітинах пухлинного мікрооточення (фібробластоподібної та моноклеарної морфології). В поодинових випадках спостерігалось незначне накопичення Casp3 навколо біомінеральних утворень та на їх поверхні. Позитивна реакція була встановлена у  $53.31 \pm 2.97$  клітин в полі зору діаметром 1 мм (рис. 4.5.6. А, В).

Імуногістохімічне дослідження раку яєчників з патологічною біомінералізацією з використанням антитіла проти CD68 продемонструвало виражену експресію у макрофагах пухлинного мікрооточення. Дані макрофаги локалізувались у клітинах строми пухлинної тканини та навколо біомінеральних утворень. Позитивна реакція до CD68 виявлена у  $52.44 \pm 3.37$  клітин в полі зору діаметром 1 мм (рис. 4.5.7. А, В).





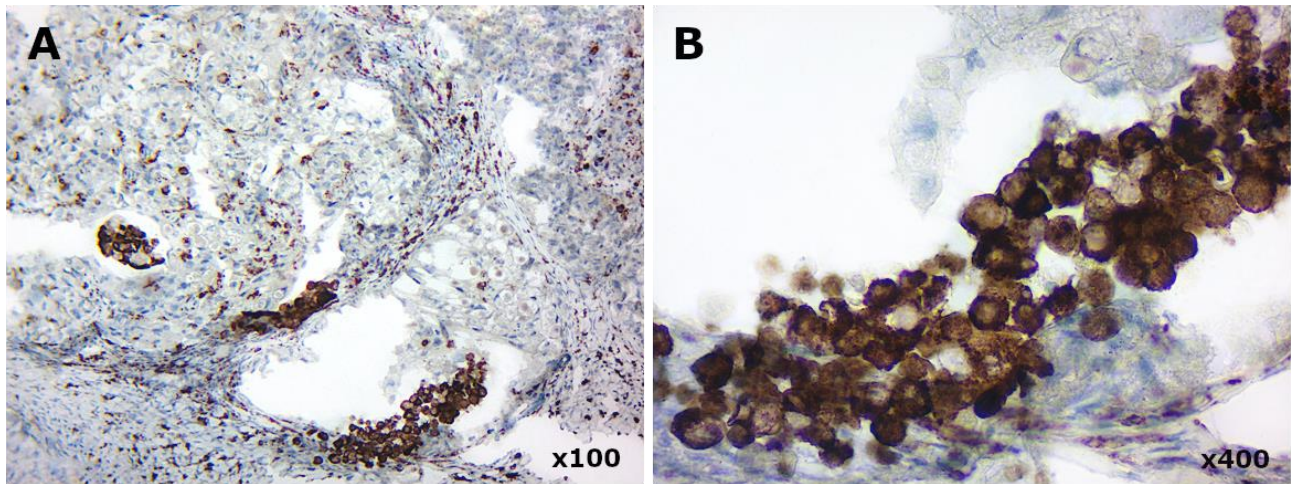
*Рисунок 4.5.6. Імуногістохімічне дослідження експресії Casp3 у тканині злоякісних новоутворень яєчників з патологічними біомінералами (група I). Ядра контрастовані гематоксилином Майєра. В правому нижньому куті вказано збільшення кожного зображення.*



*Рисунок 4.5.7. Імуногістохімічне дослідження експресії CD68 у тканині злоякісних новоутворень яєчників з патологічними біомінералами (група I). Ядра контрастовані гематоксилином Майєра. В правому нижньому куті вказано збільшення кожного зображення.*

При імуногістохімічному дослідженні для оцінки запальної інфільтрації та якісного складу макрофагів було використано антитіло проти CD163. Було встановлено помірно виражену цитоплазматичну та частково мембранну експресію CD163 в клітинах макрофагального ряду пухлинного мікрооточення. Також, позитивна реакція спостерігалась у стромальному компоненті, а саме забарвленні фібробластів із більш вираженим накопиченням навколо патологічних біомінералів та безпосередньо на їх поверхні. Позитивна

реакція у тканині раку яєчників групи I була виявлена у  $103.71 \pm 3.45$  клітин в полі зору діаметром 1 мм (рис. 4.5.8. А, В).



*Рисунок 4.5.8. Імуногістохімічне дослідження експресії CD163 у тканині злоякісних новоутворень яєчників з патологічними біомінералами (група I). Ядра контрастовані гематоксилином Майєра. В правому нижньому куті вказано збільшення кожного зображення.*

#### **4.6. Флюоресцентна мікроскопія злоякісних новоутворень яєчників з біомінеральними включеннями**

За допомогою флюоресцентної мікроскопії зразків злоякісних новоутворень яєчників з ознаками біомінералізації було встановлено накопичення OPN в ділянках біомінеральних утворень, а також візуалізувались клітини, які накопичують OPN і в той же час були CD-68 позитивними (рис. 4.6.1. А). При застосуванні комбінації антитіл CD-68 з Col I було відсутнє будь-яке накопичення флюоресцентного барвника в біомінеральних утвореннях, однак спостерігалась позитивна реакція як CD-68 так і Col I у клітинах розташованих навколо даних біомінералів.

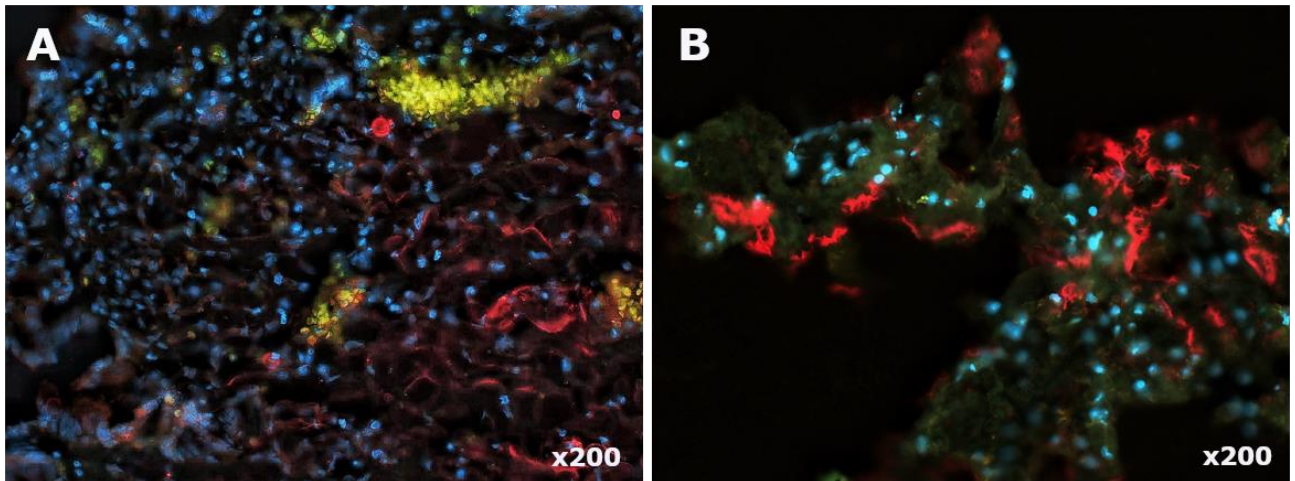


Рисунок 4.6.1. Флюоресцентна мікроскопія серозних карцином яєчників з патологічними біомінералами (група I). А – CD68 (зелений), OPN (червоний). В – CD68 (зелений), Col I (червоний). Фарбування ядер DAPI показано синім кольором. В правому нижньому куті вказано збільшення кожного зображення.

#### 4.7. Морфометричний аналіз біомінеральних включень злоякісних новоутворень яєчників

Аналіз морфометричних характеристик біомінералів на основі зображень гістологічних та імуногістохімічних методів досліджень демонстрував коливання розмірів ПТ від 12.6 до 493.7 мкм (рис. 4.7.1).

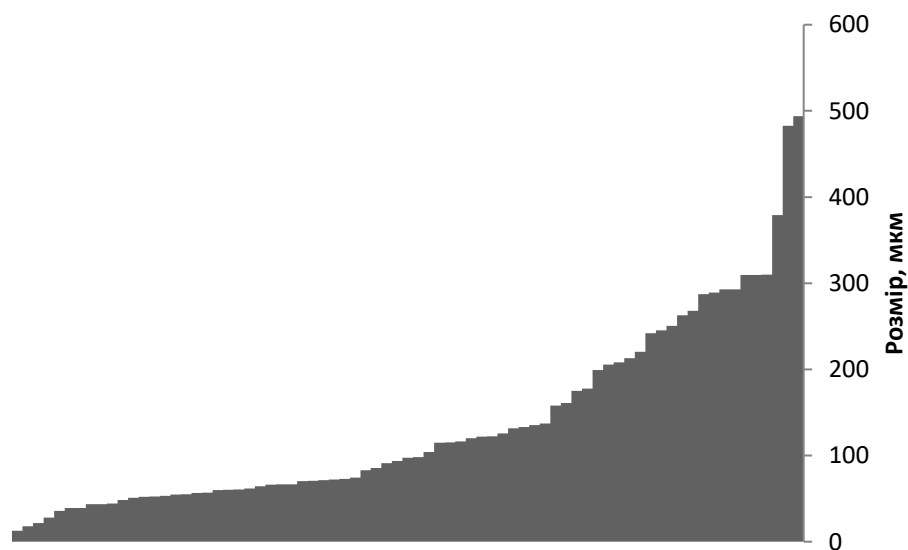
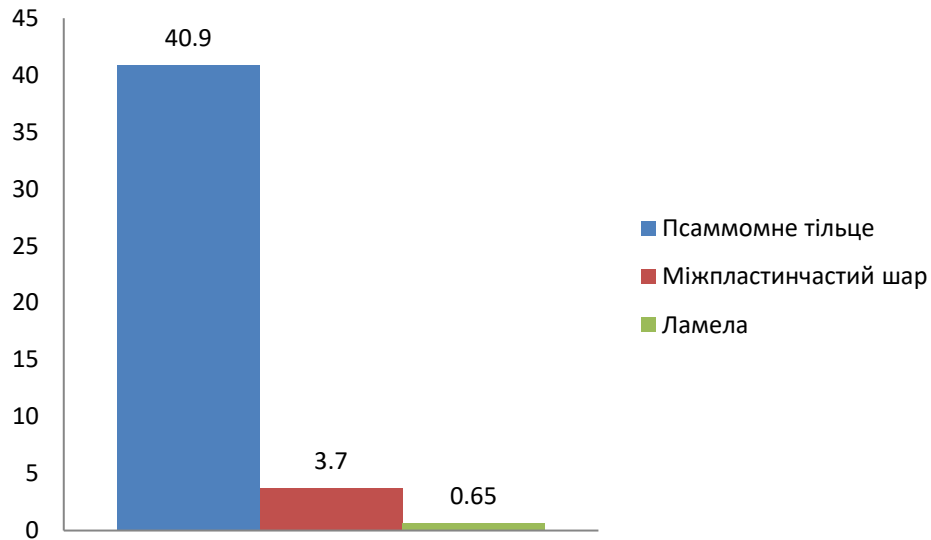


Рисунок 4.7.1. Градація розмірів псаммомних тілець при злоякісних новоутвореннях яєчників.

ПТ за своєю будовою склалися з ламел та міжпластинчастого шару, які розташовані у послідовному порядку. Дана послідовність може свідчити про циклічність процесів формування ПТ.

Середня товщина міжпластинчастого шару становила 3.7 мкм ( $\pm 0.17$ ), а середня товщина ламел дорівнювала 0.65 мкм ( $\pm 0.02$ ) (рис. 4.7.2).



*Рисунок 4.7.2. Середній розмір псаммомних тілець та їх основних структурних складових.*

Загалом, ПТ відповідно до розміру можна розділити на 3 групи: великі – більше 200 мкм (видимі при УЗД дослідженні), середні – 71 – 199 мкм та дрібні – розміром до 70 мкм.

**Матеріали з даного розділу висвітлені в наступних публікаціях:[152-159].**

## РОЗДІЛ 5

### ДОСЛІДЖЕННЯ ТКАНИНИ ЗЛОЯКІСНИХ НОВОУТВОРЕНЬ ЯЄЧНИКІВ БЕЗ ОЗНАК ПАТОЛОГІЧНОЇ БІОМІНЕРАЛІЗАЦІЇ

#### **5.1. Макроскопічне дослідження злоякісних новоутворень яєчників без ознак біомінералізації**

Для дисертаційного дослідження було відібрано 30 зразків злоякісних новоутворень яєчників без ознак біомінералізації. Контрольне підтвердження відібраних зразків відбувалось з використанням гістологічних та гістохімічних методів дослідження. Середній вік пацієток даної групи складав  $52.59 \pm 2.13$  років.

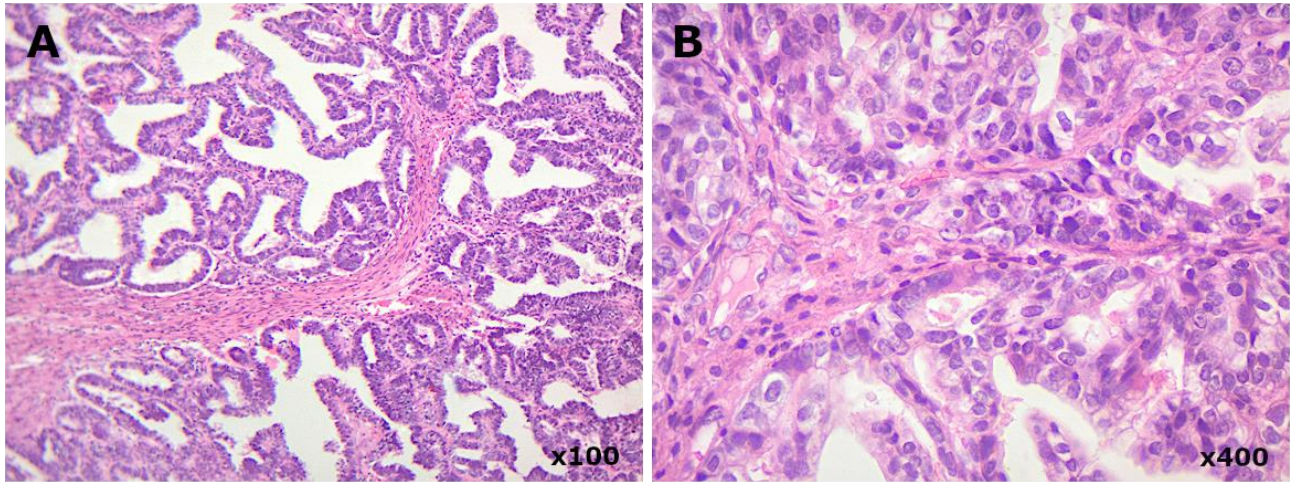
Макроскопічна будова пухлин була представлена у вигляді солідних, солідно-кістозних утворень та багатокамерних кіст, порожнина яких виповнена рідким прозорим вмістом та поділена септами, нагадуючи при цьому багатогогнищеве утворення. На внутрішній поверхні кістозних утворень візуалізувались сосочкоподібні розростання, які повністю виповнювали просвіт кісти. Солідні ділянки мали блідо-жовтий колір, містили включення некрозів та крововиливів.

Діаметр пухлинних утворень для цієї групи сягав від 5 до 120 мм, а середній показник складав  $40.38 \pm 5.82$  мм.

#### **5.1. Гістологічне дослідження злоякісних новоутворень яєчників без ознак патологічної біомінералізації**

Гістологічне дослідження злоякісних новоутворень яєчників характеризувалось папілярними, залозистими та криброзними структурами з множинними багатократними звивистими сосочками. Сосочки мали фіброзну строму та покриті атиповими епітеліальними клітинами. Ядра були великими, поліморфними, гіперхромними, іноді мали химерну конфігурацію. Ядерця чіткі, великі та еозинофільні. Хроматин в ядрах пухлинних клітин розподілений

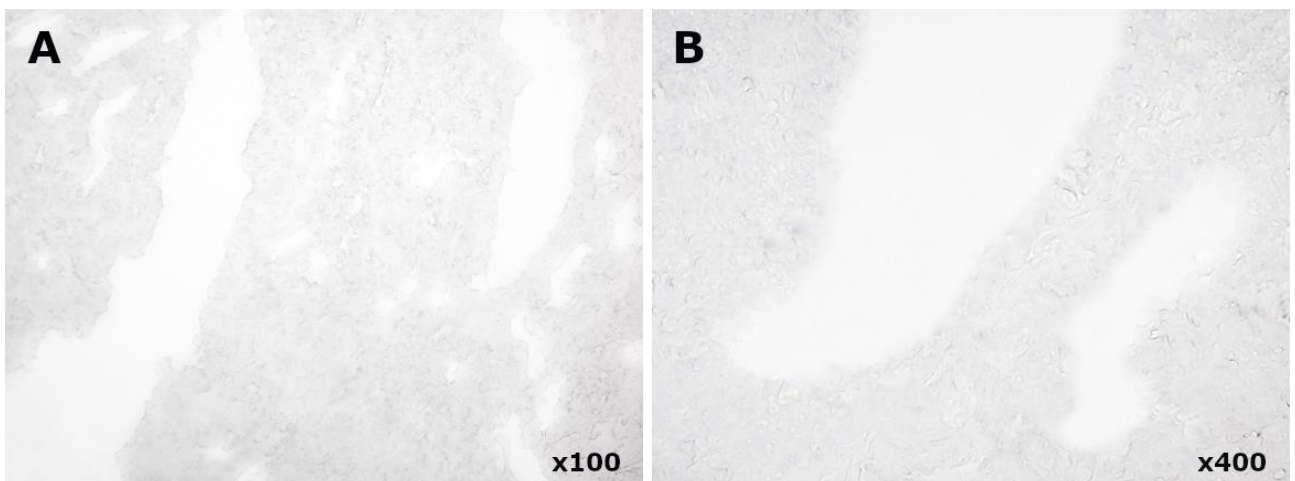
нерівномірно. Візуалізувались численні мітози. Виражений клітинний та ядерний поліморфізм. Виявлялись ділянки некрозів (рис. 5.5.1. А, В).



*Рисунок 5.1.1. Гістологічне дослідження серозних карцином яєчників яєчників без ознак патологічної біомінералізації (група II). Забарвлення гематоксиліном та еозином. В правому нижньому куті вказано збільшення кожного зображення.*

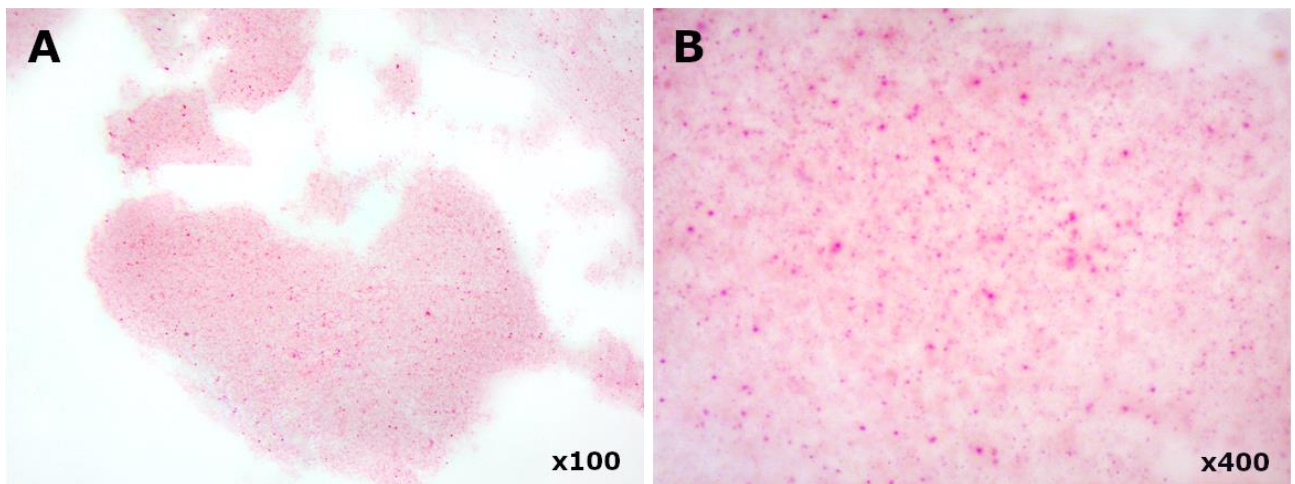
## **5.2. Гістохімічне дослідження злоякісних новоутворень яєчників без ознак патологічної біомінералізації**

Аналогічна картина спостерігалась при застосуванні барвника алізаринового червоного S, що в свою чергу додатково підтверджувало відсутність даних депозитів (рис. 5.2.1. А, В). Не спостерігалось будь якого забарвлення досліджуваних зразків даної групи.



*Рисунок 5.2.1. Гістохімічне дослідження раку яєчників без ознак патологічної біомінералізації (група II). Забарвлення алізариновим червоним S. В правому нижньому куті вказано збільшення кожного зображення.*

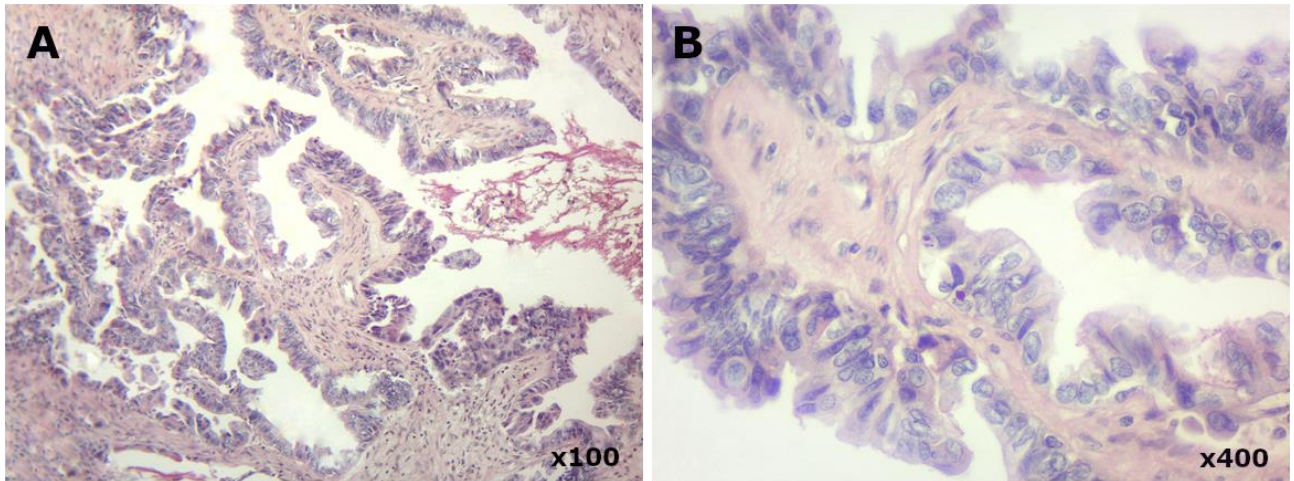
При забарвленні зразків пухлинної тканини злоякісних новоутворень яєчників (група II) за методом фон Косса спостерігалась негативна реакція, це безпосередньо свідчило про відсутність патологічних біомінералів у досліджуваних зразках (рис. 5.2.2 А, В).



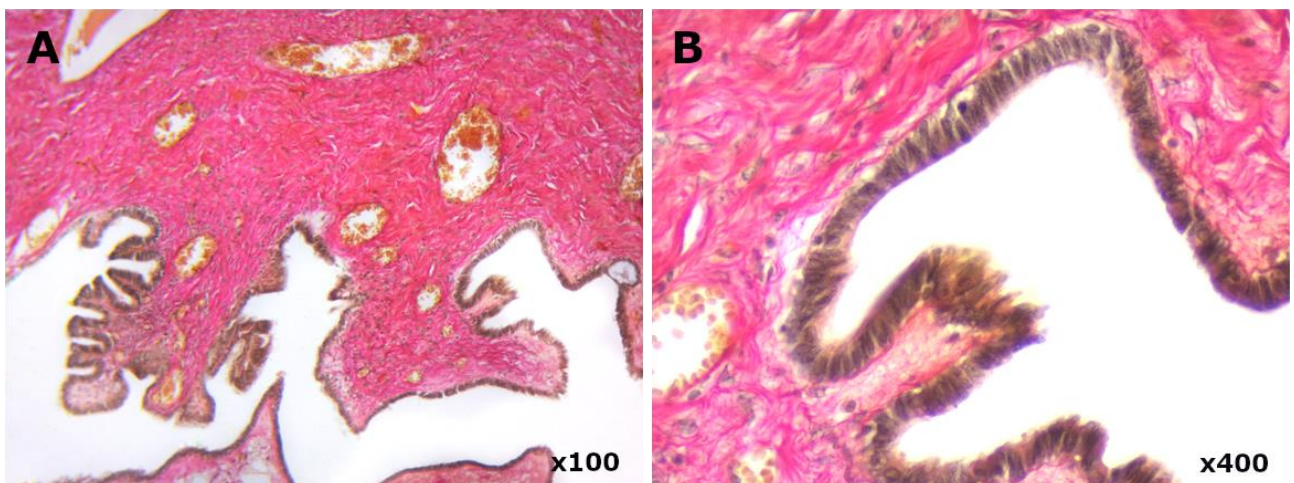
*Рисунок 5.2.2. Гістохімічне дослідження раку яєчників без ознак патологічної біомінералізації (група II). Забарвлення за фон Коссом. В правому нижньому куті вказано збільшення кожного зображення.*

PAS-реакція у досліджуваних зразках злоякісних новоутворень яєчників другої групи демонструвала негативну реакцію у стромальному компоненті пухлинної тканини, папілярних розростаннях. Відмічалась позитивна реакція у ділянках між папілярними утвореннями, так званих залишках кістозного вмісту (рис. 5.2.3. А, В).

Забарвлення за методом Ван-Гізона демонструвало ідентичну картину із досліджуваними зразками першої групи. Відмічалось забарвлення стромального компоненту пухлинної тканини злоякісних новоутворень яєчників у яскраво-червоний колір, візуалізуючи сполучну тканину та колагенові волокна (рис. 5.2.4 А, В).



*Рисунок 5.2.3. Гістохімічне дослідження раку яєчників без ознак патологічної біомінералізації (група II). Забарвлення PAS-реакцією. В правому нижньому куті вказано збільшення кожного зображення.*



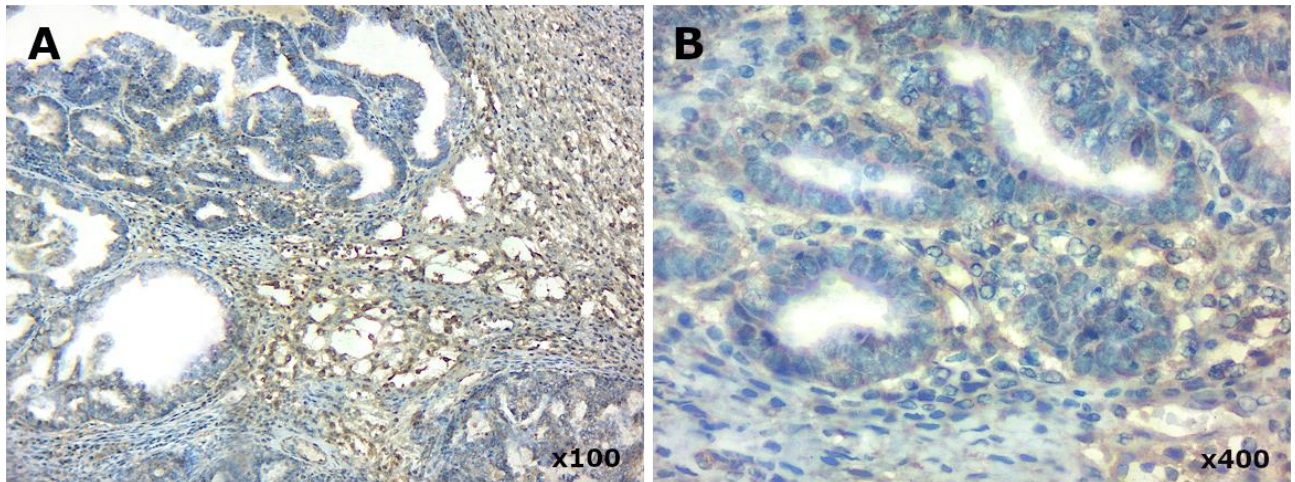
*Рисунок 5.2.4. Гістохімічне дослідження раку яєчників без ознак патологічної біомінералізації (група II). Забарвлення за методом Ван-Гізона. В правому нижньому куті вказано збільшення кожного зображення.*

### **5.3. Імуногістохімічне дослідження злоякісних новоутворень яєчників без ознак патологічної біомінералізації**

При проведенні ІГХ дослідження з використанням антитіла проти OPN було встановлено помірно виражену цитоплазматичну експресію у клітинах пухлинного мікрооточення (клітинах мононуклеарної та фібробластоподібної морфології). Спостерігалась позитивна реакція з низькою інтенсивністю у



пухлинних клітинах. Експресія у тканини раку яєчників другої групи було виявлено в  $26.93 \pm 1.88$  клітин в полі зору діаметром 1 мм (рис. 5.3.1. А, В).



*Рисунок 5.3.1. Імуногістохімічне дослідження експресії OPN у тканині раку яєчників без ознак патологічної біомінералізації (група II). Ядра контрастовані гематоксилином Майєра. В правому нижньому куті вказано збільшення кожного зображення.*

При використанні антитіла проти OPN в ІГХ дослідженні другої групи було встановлено помірно виражену експресію в цитоплазмі пухлинних клітин. Як і в першій групі спостерігалась позитивна реакція в клітинах стромального компонента пухлини яєчника та ділянках запального інфільтрату. Експресія OPN в досліджуваних зразках даної групи складала  $58.57 \pm 3.54$  клітин в полі зору діаметром 1 мм (рис. 5.3.2. А, В).

Використання антитіла проти RANKL в ІГХ дослідженні продемонструвало негативну реакцію в пухлинних клітинах, лише в поодиноких випадках спостерігалась позитивна реакція низької інтенсивності, що є доволі сумнівною. Помірно виражена експресія спостерігалась в клітинах запального інфільтрату та поодиноких клітинах пухлинного мікрооточення. Експресія RANKL в даній групі складала  $54.52 \pm 3.49$  клітин в полі зору діаметром 1 мм (рис. 5.3.3. А, В).

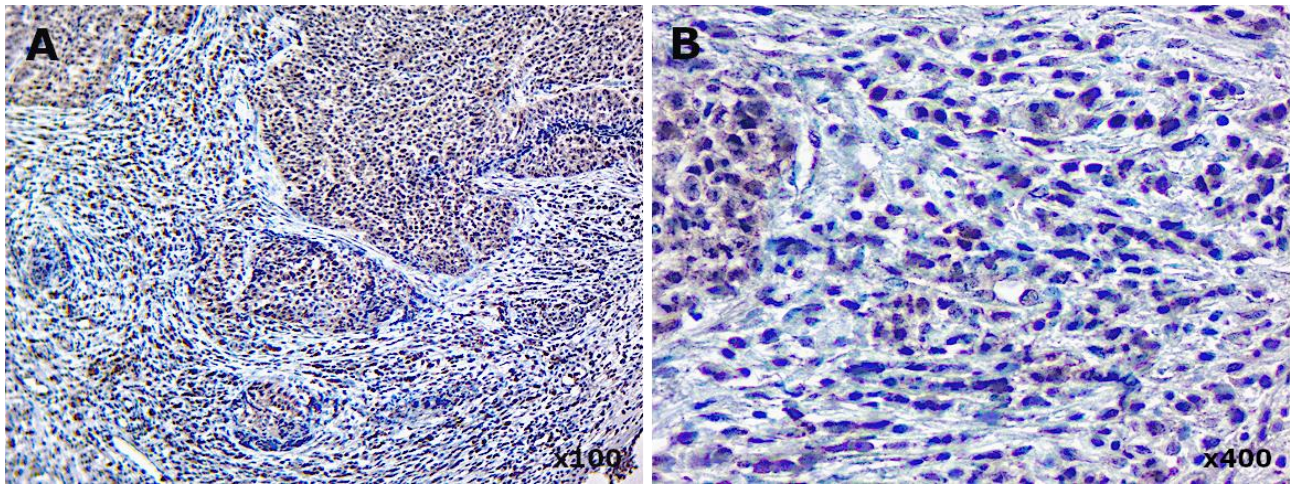


Рисунок 5.3.2. Імуногістохімічне дослідження експресії OPG у тканині раку яєчників без ознак патологічної біомінералізації (група II). Ядра контрастовані гематоксиліном Майєра. В правому нижньому куті вказано збільшення кожного зображення.

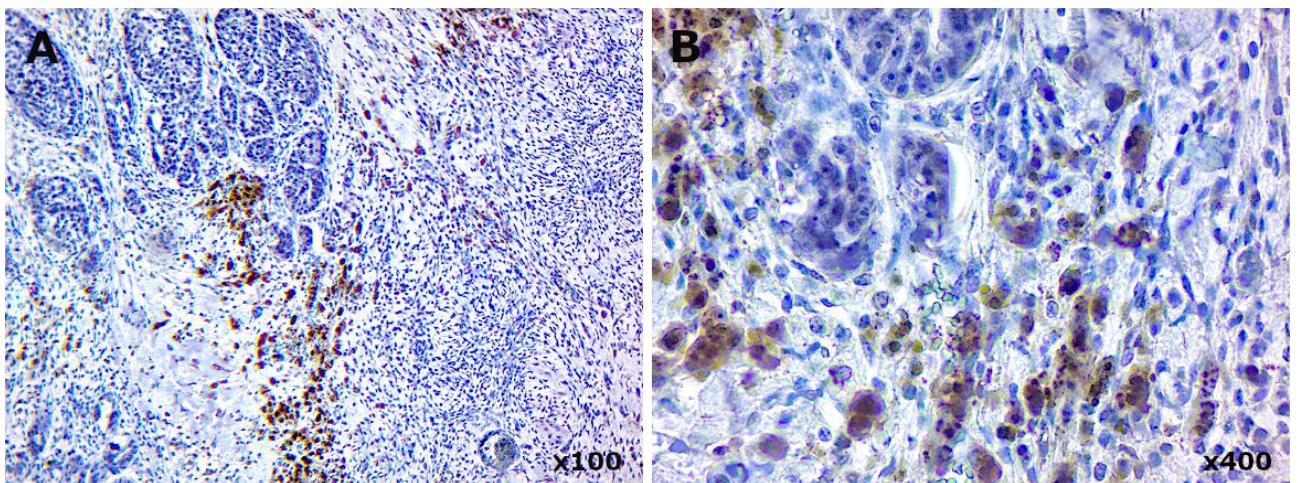


Рисунок 5.3.3. Імуногістохімічне дослідження експресії RANKL у тканині раку яєчників без ознак патологічної біомінералізації (група II). Ядра контрастовані гематоксиліном Майєра. В правому нижньому куті вказано збільшення кожного зображення.

При ІГХ дослідженні з використанням антитіла проти SPARC було встановлено експресію низької інтенсивності в пухлинних клітинах. Виражена позитивна реакція спостерігалась в клітинах пухлинного мікрооточення з переважанням в клітинах запального інфільтрату. Позитивна реакція в клітинах раку яєчників до SPARC даної групи складала  $63.19 \pm 3.39$  клітин в полі зору діаметром 1 мм (рис. 5.3.4. А, В).

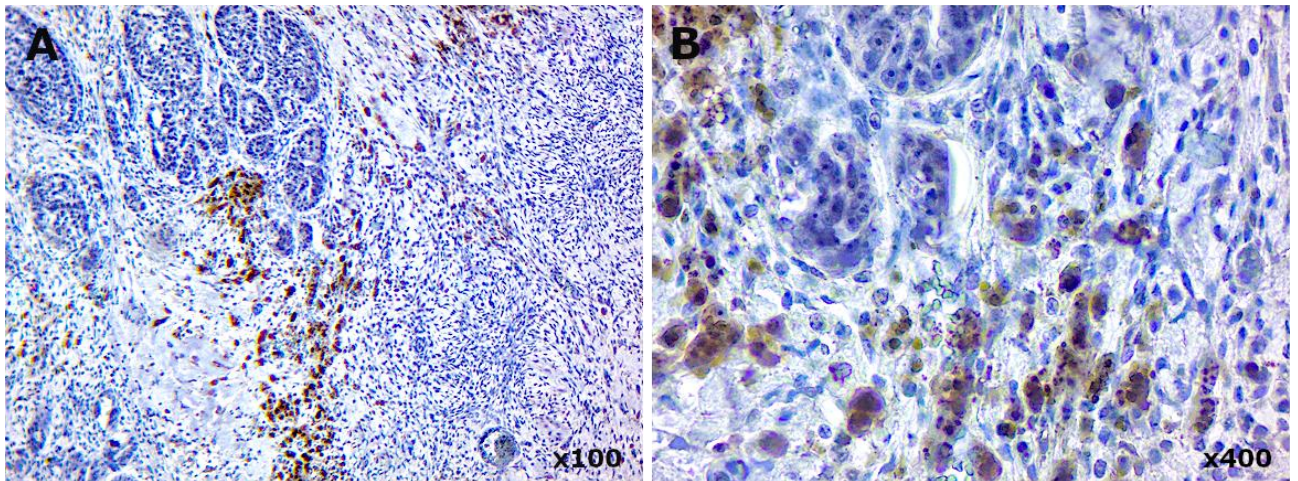


Рисунок 5.3.3. Імуногістохімічне дослідження експресії RANKL у тканині раку яєчників без ознак патологічної біомінералізації (група II). Ядра контрастовані гематоксиліном Майєра. В правому нижньому куті вказано збільшення кожного зображення.

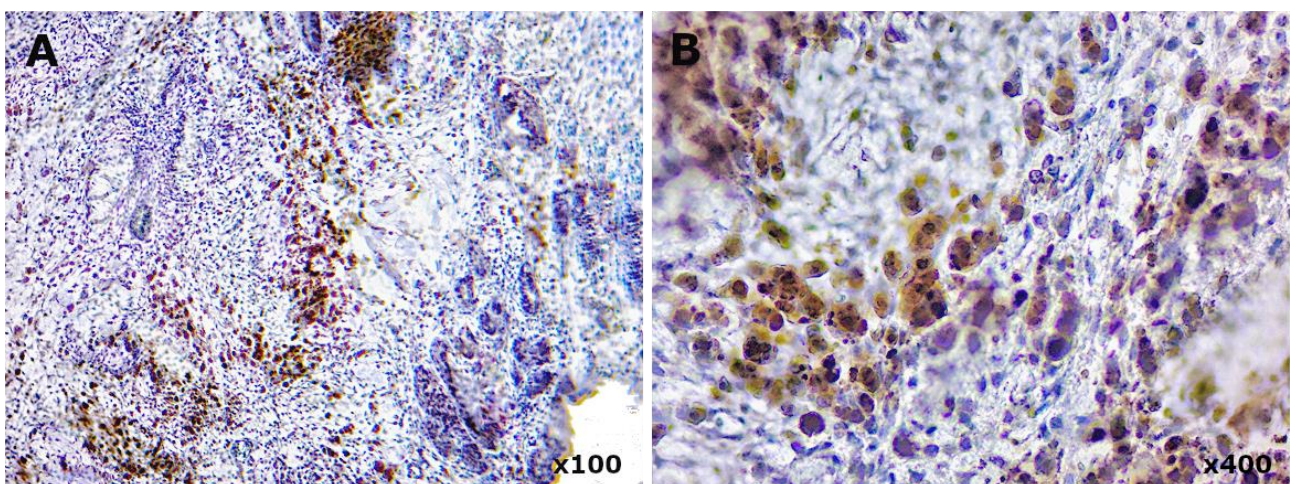


Рисунок 5.3.4. Імуногістохімічне дослідження експресії SPARC у тканині раку яєчників без ознак патологічної біомінералізації (група II). Ядра контрастовані гематоксиліном Майєра. В правому нижньому куті вказано збільшення кожного зображення.

При ІГХ дослідженні встановлено помірно виражену експресію Casp3 клітинами пухлинного мікрооточення, яке представлене в більшості випадків фібробластоподібними клітинами та мононуклеарної морфології. Також, спостерігалась негативна реакція в пухлинних клітинах. Позитивна реакція в зразках раку яєчників складала  $47.07 \pm 2.99$  клітин в полі зору діаметром 1 мм (рис. 5.3.5. А, В).

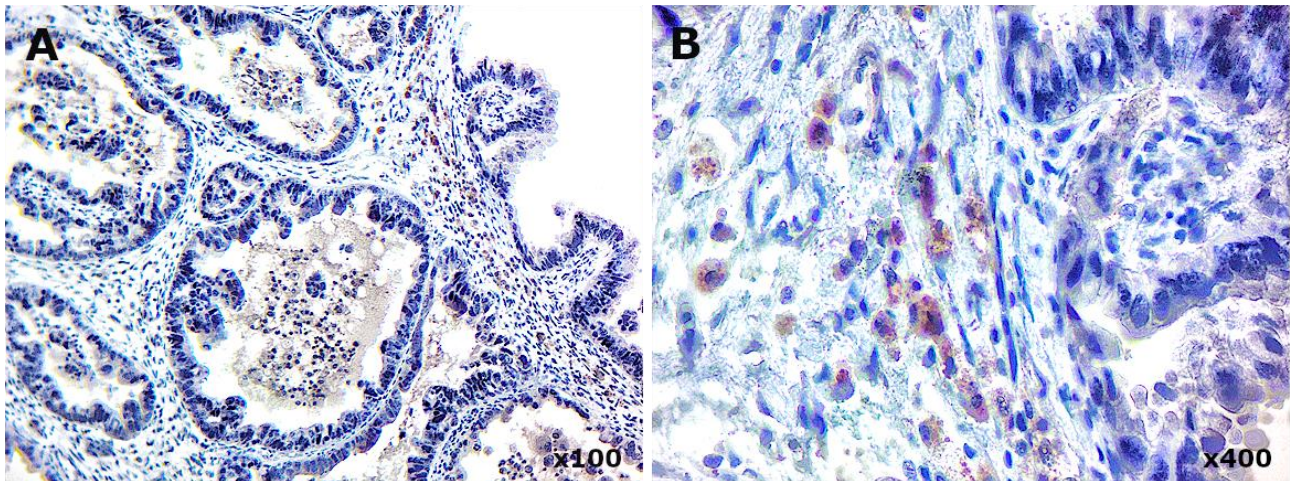


Рисунок 5.3.5. Імуногістохімічне дослідження експресії Casp3 у тканині раку яєчників без ознак патологічної біомінералізації (група II). Ядра контрастовані гематоксилином Майєра. В правому нижньому куті вказано збільшення кожного зображення.

При використанні антитіл проти CD68 встановлено позитивну реакцію в цитоплазмі макрофагів пухлинного мікрооточення, які переважно локалізувались в стромі пухлинної тканини та між пухлинними клітинами папілярних розростань. У тканині раку яєчників другої групи було виявлено  $60.87 \pm 3.14$  CD68-позитивних клітин в полі зору діаметром 1 мм (рис. 5.3.6. А, В).

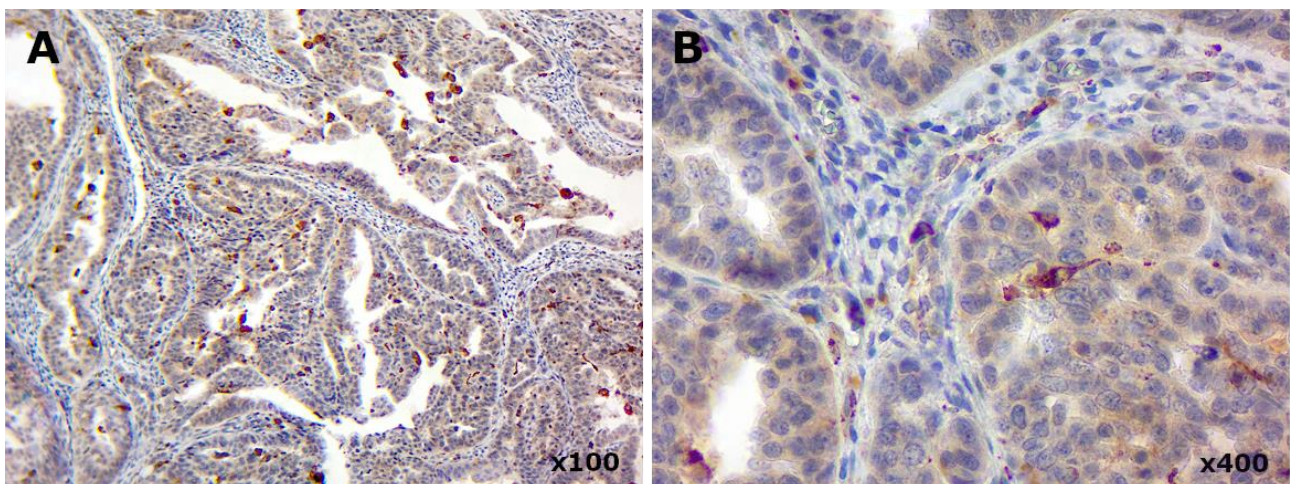
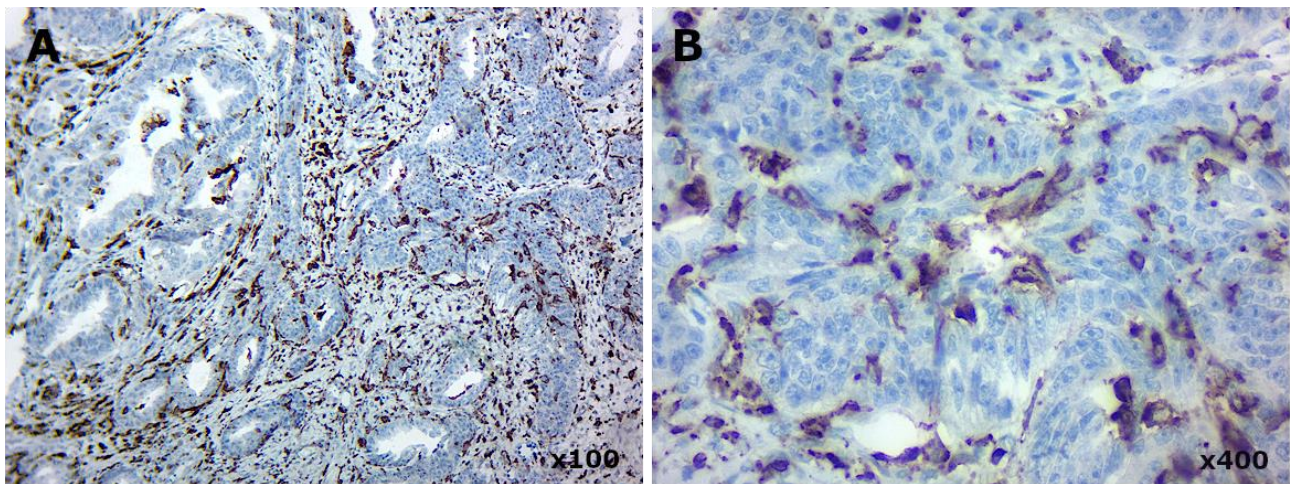


Рисунок 5.3.6. Імуногістохімічне дослідження експресії CD68 у тканині раку яєчників без ознак патологічної біомінералізації (група II). Ядра контрастовані гематоксилином Майєра. В правому нижньому куті вказано збільшення кожного зображення.

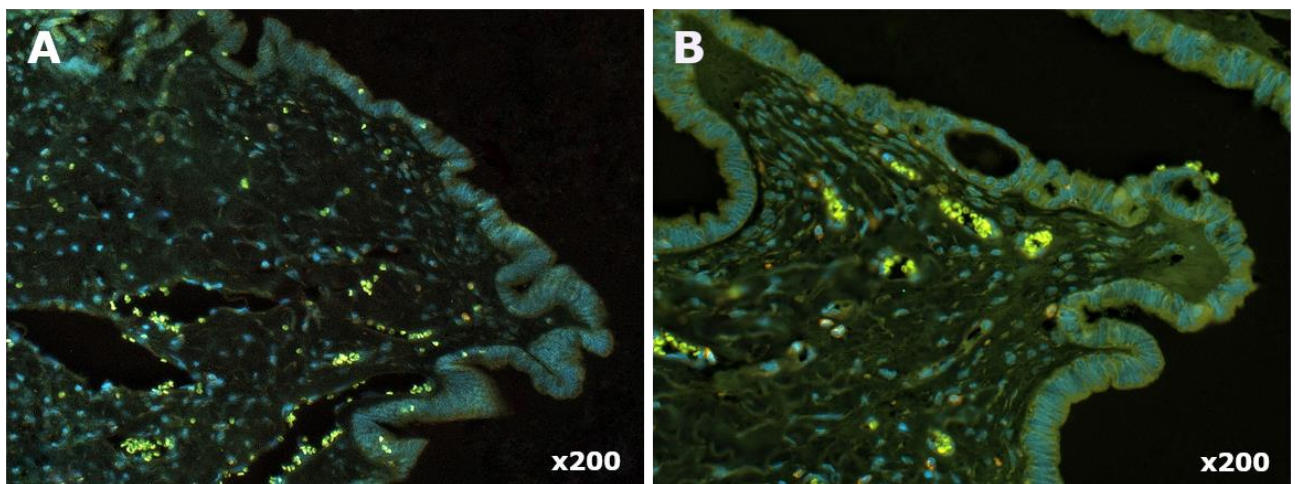
При ІГХ дослідженні з використанням антитіла проти CD163 було встановлено позитивну цитоплазматичну реакцію в клітинах макрофагального ряду пухлинного мікрооточення. Також, спостерігались CD163-позитивні клітини у стромі пухлинної тканини, а саме веретеноподібних клітинах та ділянках запального інфільтрату. Експресія CD163 в даній групі складала  $95.02 \pm 3.36$  клітин в полі зору діаметром 1 мм (рис. 5.3.7. А, В).



*Рисунок 5.3.7. Імуногістохімічне дослідження експресії CD163 у тканині раку яєчників без ознак патологічної біомінералізації (група II). Ядра контрастовані гематоксилином Майєра. В правому нижньому куті вказано збільшення кожного зображення.*

#### 5.4. Флюоресцентна мікроскопія злоякісних новоутворень яєчників без ознак патологічної біомінералізації

При використанні комбінації антитіл проти CD68 + OPN та CD68 + Col I в тканині зразків злоякісних новоутворень яєчників без біомінералізації не було виявлено будь-якого значного накопичення в клітинах OPN та Col I. При тому, хоча клітини макрофагального ряду візуалізувалися у стромі пухлин, проте локалізації з відкладеннями як остеопонтину, так і колагену 1 типу. Як артефакт, відмічається яскрава реакція в еритроцитах, які розташовані внутрішньосудинно.



*Рисунок 5.4.1. Флюоресцентна мікроскопія раку яєчників без ознак патологічної біомінералізації (група II). А, В – CD68 (зелений). Фарбування ядер DAPI показано синім кольором. В правому нижньому куті вказано збільшення кожного зображення.*

**Матеріали з даного розділу висвітлені в наступних публікаціях: [152, 154, 157-159].**

## РОЗДІЛ 6

### СТРУКТУРНИЙ ТА ФІЗИКО-ХІМІЧНИЙ АНАЛІЗ БІОМІНЕРАЛЬНИХ ВКЛЮЧЕНЬ РАКУ ЯЄЧНИКІВ

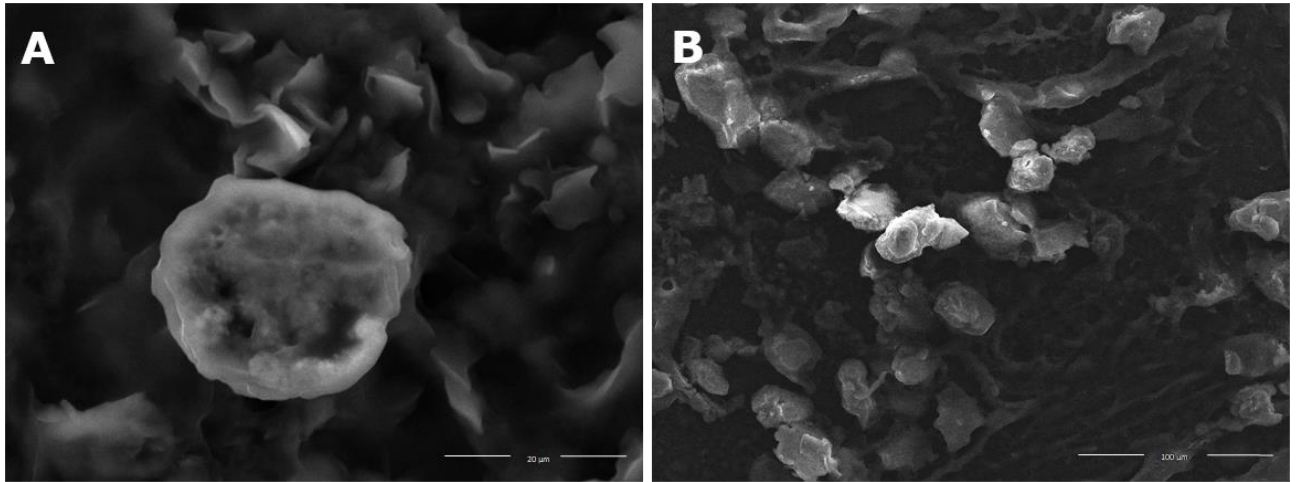
Для вивчення структури біомінеральних утворень злоякісних новоутворень яєчників з першої групи було проведено ряд досліджень, таких як ультразвукова діагностика, макроскопічне дослідження, гістологічне, гістохімічне забарвлення патологічних біомінералів алізариновим червоним S та за методом фон Косса, які детально описані в розділі 4. Для вивчення структурної та фазової складової даних біомінералів було проведено сканувальну електронну мікроскопію (SEM), просвітлювальну електронну мікроскопію (ПЕМ), рентгенівську дифракцію та хімічний аналіз, на яких безпосередньо і акцентує свою увагу даний розділ.

#### **6.1. Сканувальна електронна мікроскопія (SEM)**

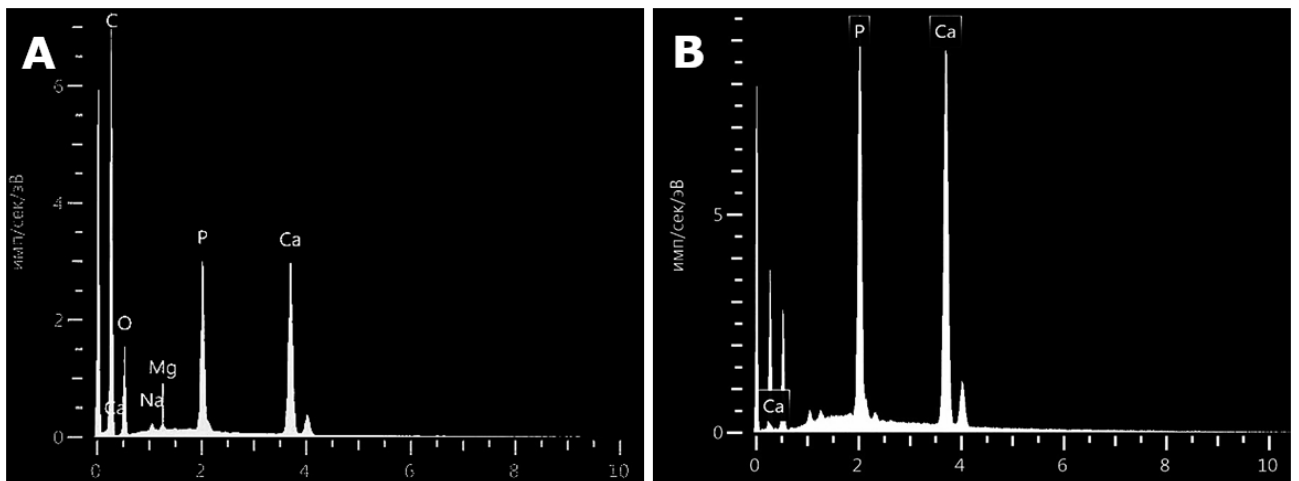
Для сканувальної електронної мікроскопії зразки злоякісних новоутворень яєчників першої групи попередньо проходили відповідну підготовку за спеціально розробленою методикою та були представлені у вигляді гістологічних зрізів.

При проведенні SEM було встановлено, що біомінеральні депозити являють собою часточки різного розміру, кольорова гама яких варіювала від білого до темно-сірого з досить широким спектром їх комбінацій. Вони мали сферичну, округлу форму та ламку структуру, що безпосередньо підтверджується наявними уламками химерної конфігурації. При великих збільшеннях злами характеризувалися пористою структурою мінеральних відкладень. На поверхні біомінералів виявлялися кристалічні структури сферичної та голчастої форми. В деяких випадках дані депозити імітували структури пухлинної тканини, відтворюючи форму «ложа». Також, спостерігалась відмінність у щільності і однорідності оболонки та ядра біомінеральних утворень. Оскільки, оболонка була представлена у вигляді

однорідної щільної структури, в той час як ядро мало неоднорідне забарвлення, яке візуально нагадувало хмароподібну структуру (рис. 6.1.1. А, В).



*Рисунок 6.1.1. Серозні карциноми яєчників з патологічними біомінералами (група I). А, В – сканувальна електронна мікроскопія. В правому нижньому куті вказано збільшення кожного зображення.*



*Рисунок 6.1.2. Серозні карциноми яєчників з патологічними біомінералами (група I). А, В – ЕДС спектри.*

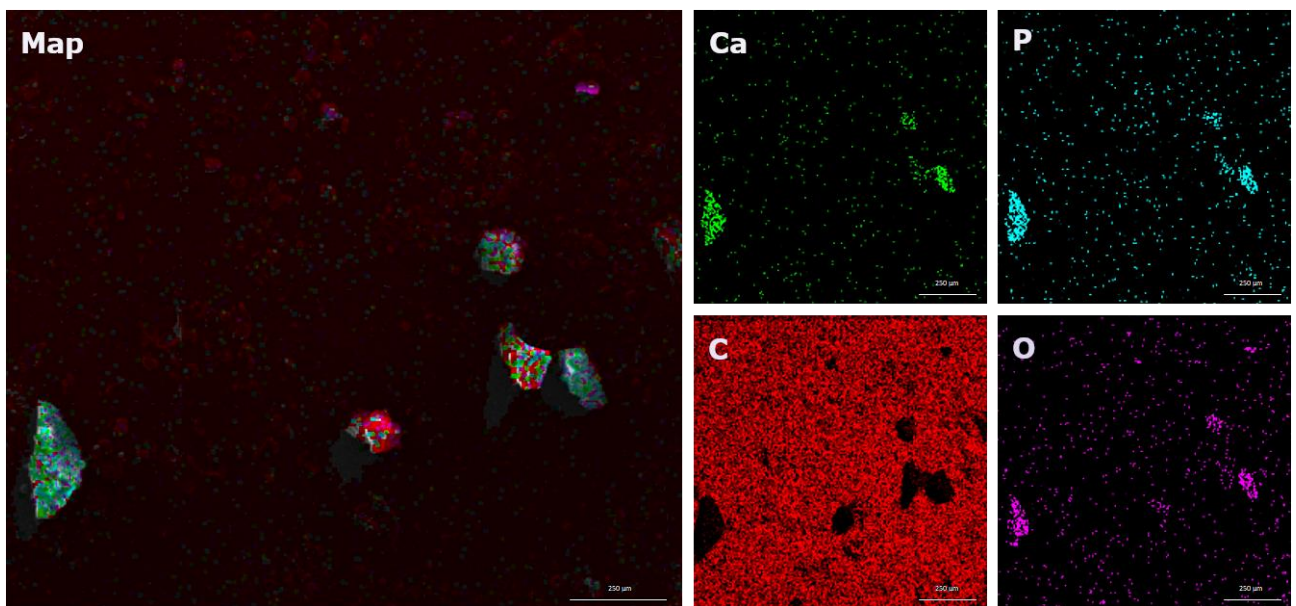
#### *ЕДС аналіз біомінеральних включень*

В ЕДС спектрах досліджуваних зразків були виявлені основні лінії кальцію (Ca) та фосфору (P) (рис. 6.1.2. А, В). Також, у деяких випадках візуалізувались незначно виражені лінії кисню (O), карбону (C), магнію (Mg), натрію (Na) та інші (рис. 6.1.2. А). Співвідношення інтенсивності ліній Ca та P відображали характерні ознаки гідроксиапатиту  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . Однак, в деяких спектрах відмічалась незначна різниця мікроелементного складу.



### *ЕДС-картування*

За даними карт розподілу елементів (рис. 6.1.3) було встановлено підвищення вмісту кальцію та фосфору в місцях локалізації біомінеральних частинок. Локалізація кисню спостерігалась в ідентичних місцях розташування кальцію та фосфору. Відмічався досить рівномірний розподіл вуглецю по полю сканування з відсутніми ознаками накопичення в місцях локалізації мінералізованих частинок (екранування біомінералом вуглецевмісної поверхні графітового столика від електронного пучка).

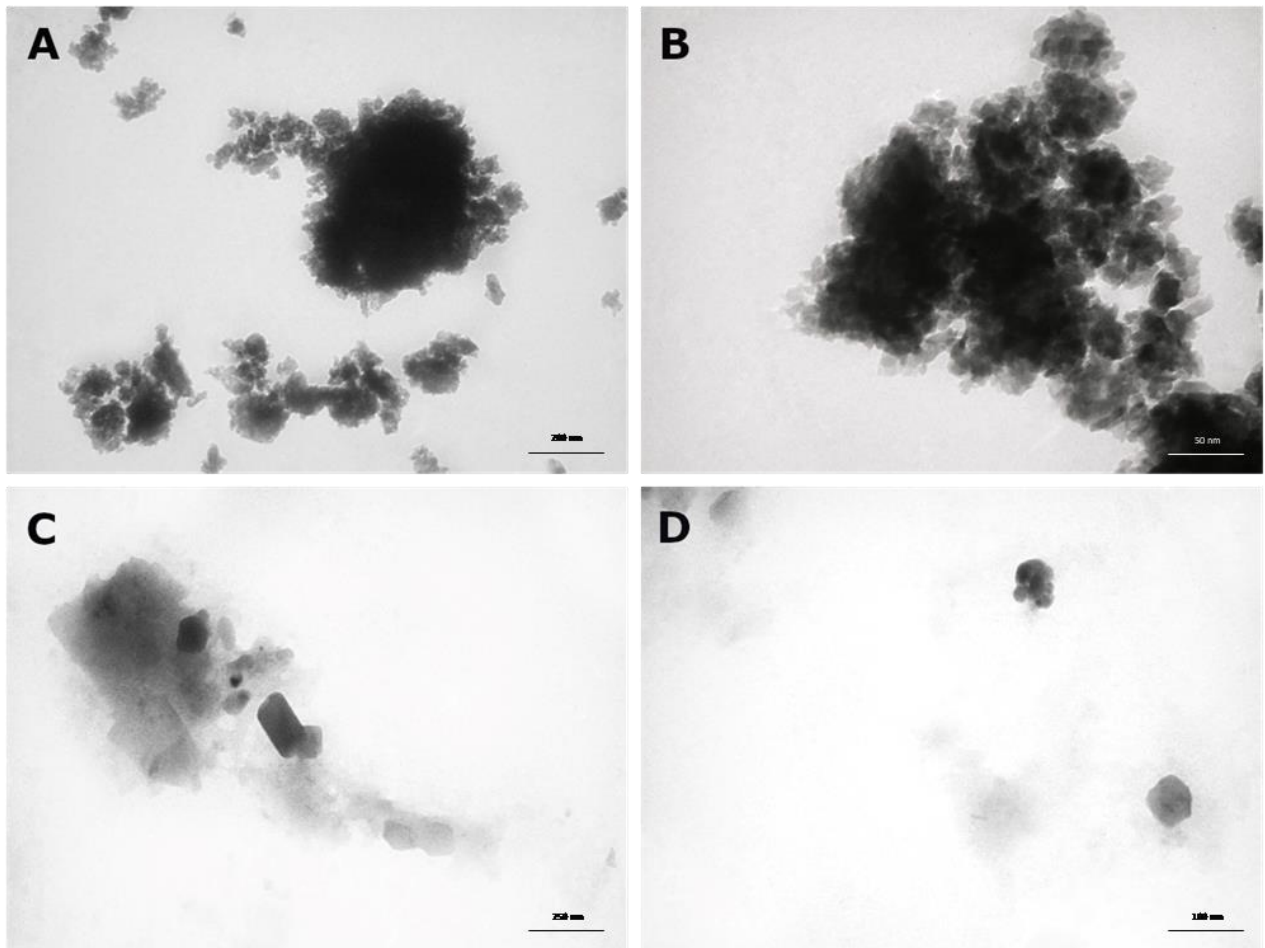


*Рисунок 6.1.3. Серозні карциноми яєчників з патологічними біомінералами (група I). ЕДС-картування, іони кальцію (Ca) позначено зеленим, фосфору (P) – голубим, карбону (C) – червоним, кисню (O) – фіолетовим. В правому нижньому куті вказано збільшення кожного зображення.*

## 6.2. Просвітлювальна електронна мікроскопія (ПЕМ)

Дослідження мікроструктури біомінеральних утворень за допомогою ПЕМ на електронно-мікроскопічному зображенні показало, що біомінеральні депозити являють собою стабільні нанокристали розмірами від 8 до 540 нм. Найбільш ймовірними були кристали розміром від 40 до 50 нм, в оточенні дрібних кристалічних часточок (5 – 15 нм), що ілюструє полідисперсну морфологію нанорозмірних кристалів патологічного депозиту (рис. 6.2.1. А, В).

Відносно великі (250 – 540 нм) кристали збиралися в конгломерації за переважною орієнтацією кристалографічних площин, про що свідчать точкові рефлекси на електронограмах (рис. 6.2.1. С).



*Рисунок 6.2.1. Просвітлювальна електронна мікроскопія серозних карцином яєчників з патологічними біомінералами (група I). А, В, С, D – кристали біомінералів. В правому нижньому куті вказано збільшення кожного зображення.*

Частинки від 50 до 250 нм в більшості зразків представляють собою об'єднання менших кристалів. Такі частинки-об'єднання не мають чіткої огранки, а між кристалітами знаходиться аморфна речовина (рис. 6.2.1. D).

Отже, за допомогою ПЕМ встановлено, що кристали апатиту здебільшого являються полідисперсними, але можуть бути і монодисперсними. Полікристалічність матеріалу зразків встановлено на основі картини ЕД. Аналіз електроннограм показав, що кристали також можуть мати в своєю структурному складі залишки кальциту ( $\text{Ca}(\text{CO}_3)$ ). (рис. 6.2.2. А, В).

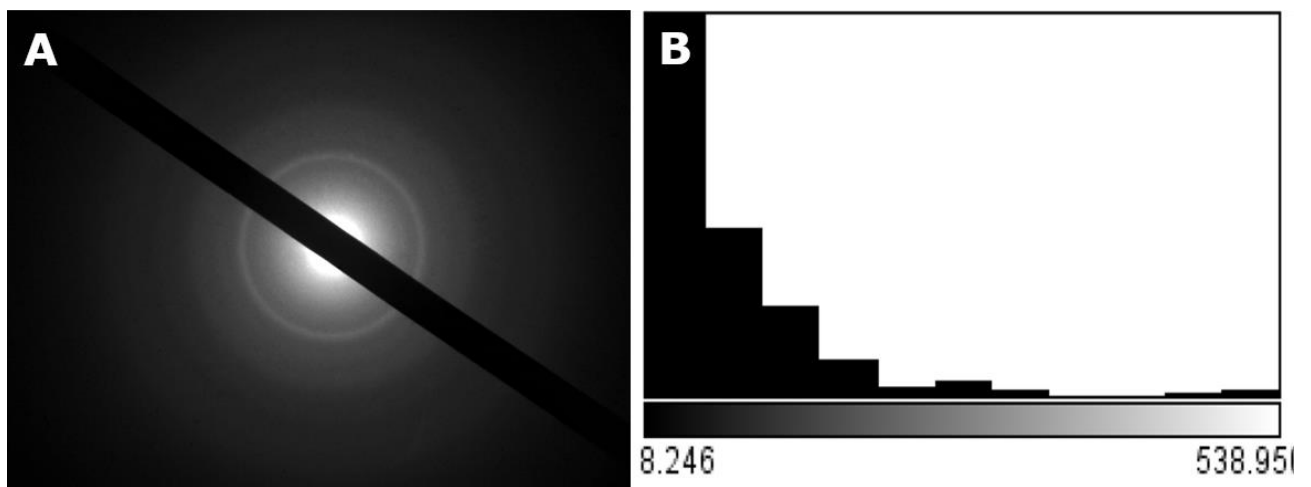


Рисунок 6.2.2. Серозні карциноми яєчників з патологічними біомінералами (група I). А – електронна дифракція. В – гістограма розподілу розмірів наночастинок кристалів.

### 6.3. Рентгенівська дифракція

За допомогою рентгенівської дифракції було встановлено, що кристалічною фазою «первісного» (відпаленого при 200 °С) патологічного мінераліту є нанокристалічний структурно-дефектний апатит, тоді як високотемпературний відпал (950 °С) приводить до рекристалізації з формуванням єдиної добре кристалізованої фази стехіометричного гідроксиapatиту кальцію ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) (рис. 6.3.1), вірогідність іонних заміщень в структурі якого нехтовно мала.

Це переконливо вказує на те, що в місці формування патологічного мінерального депозиту концентрації іонів кальцію і фосфатів у біологічних рідинах строго відповідають стехіометрії гідроксиapatиту, або ж надлишки цих та інших іонів залишаються у розчиненому (рухливому) стані і в мінералі не депонуються.

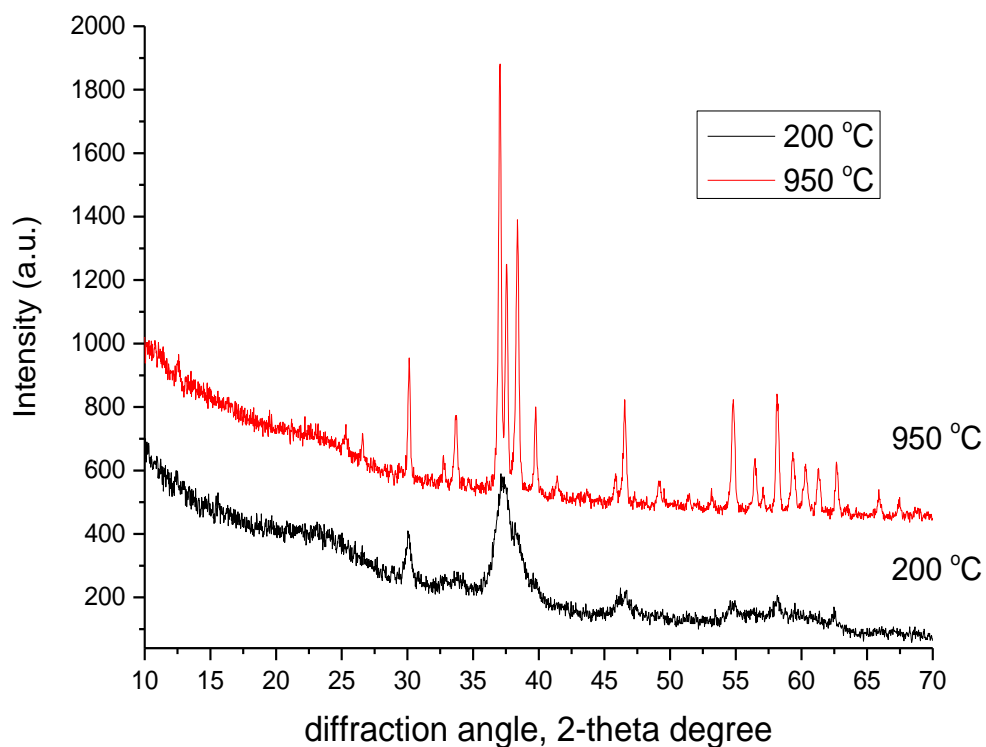


Рисунок 6.3.1. Рентгенівська дифракція патологічних біомінералів серозних карцином яєчників.

#### 6.4. Хімічний аналіз

Для встановлення мікроелементного складу біомінеральних утворень було проведено хімічний аналіз зразків раку яєчників першої групи. Проводився порівняльний аналіз біомінеральних депозитів (група 1) та прилеглої пухлинної тканини раку яєчників (група 2). Було досліджено, що основним елементом в першій групі було залізо (Fe), друге місце посідає магній (Mg), визначались у невеликій кількості цинк (Zn) та мідь (Cu) (рис. 6.4.1. А).

В той же час, основним елементом другої групи був магній (Mg), друге місце посідало залізо (Fe) і аналогічно до першої групи у невеликій кількості визначалися цинк (Zn) та мідь (Cu) (рис. 6.4.1. В).

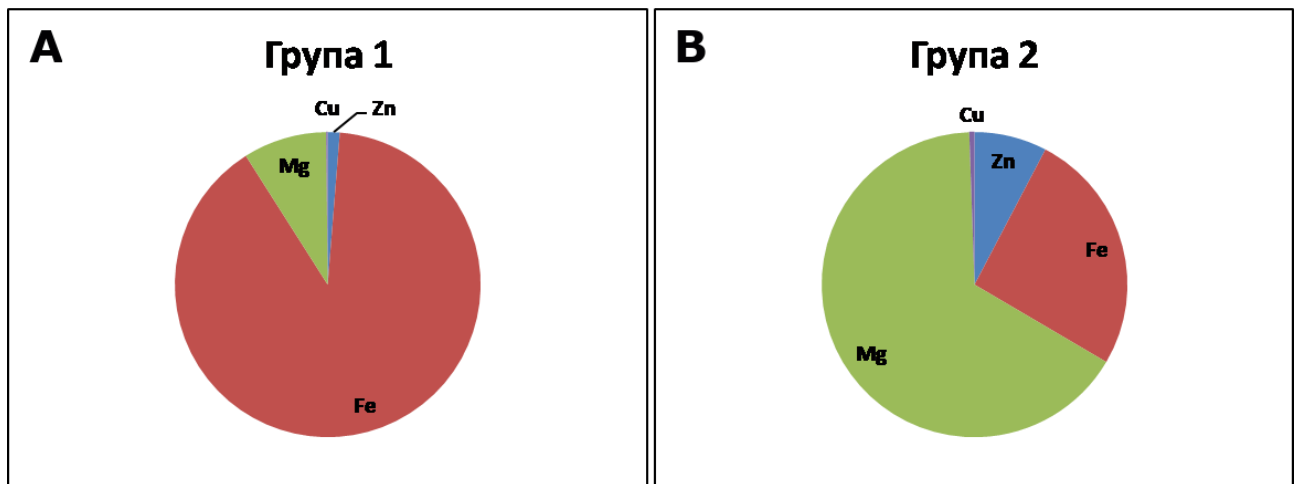


Рисунок 6.4.1. А – частка мікроелементів в складі біомінеральних утворень; В – частка мікроелементів в складі пухлинної тканини.

Порівнюючи мікроелементний склад між групою 1 (кальцифікована тканина) та групою 2 (тканини пухлини) було встановлено знижений рівень цинку (Zn) у першій групі відносно другої на 41.83%. Рівень магнію (Mg) в першій групі також знижений на 52.17%. Вміст заліза (Fe) та міді (Cu) в першій вище порівняно з другою групою на 91.77% та 7.8% відповідно (табл. 6.4.2).

*Таблиця 6.4.2. Мікроелементний склад зляжисних новоутворень яєчників з (група 1) та без (група 2) патологічних біомінералів.*

|                           | <b>Група 1</b>  | <b>Група 2</b>  |
|---------------------------|-----------------|-----------------|
| Zn (цинк), мг % на золу   | 0.01986±0.00096 | 0.03414±0.01312 |
| Fe (залізо), мг % на золу | 1.40461±0.9452  | 0.11559±0.07022 |
| Mg (магній), мг % на золу | 0.13886±0.01707 | 0.29034±0.05029 |
| Cu (мідь), мг % на золу   | 0.00269±0.00092 | 0.00248±0.00096 |

**Матеріали з даного розділу висвітлені в наступних публікаціях:** [152, 153, 160-162].

## РОЗДІЛ 7

### АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

На основі даних Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), встановлено, що найвищий показник захворюваності відзначається в індустріально розвинених країнах світу. Безпосередньо, це стосується Центральної та Східної Європи де середній показник захворюваності становить 10.7 випадків на 100 тис. населення [4]. Крім того, найнижчий рівень захворюваності встановлено в країнах Африки та Східної Азії з середнім показником 4.4 та 5.7 випадків на 100 тис. населення відповідно [5]. Вища поширеність захворюваності на рак яєчників у розвинених країнах у порівнянні з країнами, які лише на шляху розвитку, може бути наслідком багатьох факторів. По-перше, це значне збільшення тривалості життя в розвинених країнах. По-друге, це значне зниження народжуваності, у порівнянні з країнами, які не досягли значного розвитку, де все існують великі сім'ї, а жінки все ще мають мотивацію до збільшення кількості вагітностей. Крім того, у розвинених країнах, жінки менш схильні до практики грудного вигодовування. Оскільки, встановлено, що саме грудне вигодовування є захисним фактором у виникненні раку яєчників і його захисний ефект може тривати майже 30 років після припинення грудного вигодовування [4, 5, 10]. По-третє, у розвинених країнах західний спосіб життя, який в свою чергу має великий вплив на збільшення виникнення того чи іншого типу пухлинного процесу, включаючи рак яєчників [7-11]. В той же час, в розвинених країнах доволі поширене щоденне споживання жирної та висококалорійної їжі, яке також має безпосередній вплив на розвиток раку. Надмірна вага та ожиріння також знаходять своє відображення у розвитку даної патології. А у жінок із раком яєчників, ожиріння в основному пов'язане із зниженням якості життя та зниженням п'ятирічної виживаності [12, 13, 15].

В той же час, середній показник захворюваності в Україні становить 11.06 випадків на 100 тис. жіночого населення. Зокрема Сумська область характеризується вищим рівнем захворюваності на рак яєчників складаючи

11.33 випадків на 100 тис. жіночого населення в порівнянні з загальнодержавним [22]. На основі аналізу статистичних даних Національного канцер реєстру, Сумського обласного канцер-реєстру та статистичного відділу Сумського обласного клінічного онкологічного центру впродовж 2014–2021 років зареєстровано 27104 випадків раку яєчників, з середнім показників показником за рік –  $3388 \pm 59.02$ . Встановлено, що найвищий показник захворюваності в Україні був зареєстрований в 2014–2015 та 2019 роках складаючи 11.5 та 11.6 випадків раку яєчників на 100 тис. жіночого населення). В той же час, найнижчий показник зареєстрований в 2020 році сягаючи при цьому 10.2 випадків на 100 тис. жіночого населення. Нами було встановлено, що на період спостереження (2014–2021 рр.) середній показник захворюваності на рак яєчників в Сумській області перевищував загальнодержавний рівень майже кожного року. Виключенням стали 2014, 2017 та 2020 років, де показник був нижче. Також, було відмічено, що в 2016 році спостерігалась тенденція до зниження захворюваності як в Україні, так і в Сумській області. При тому, в 2017 та 2020 роках показник захворюваності продемонстрував тенденцію до зниження на 11.8 % та 22.05 % в Сумській області відповідно. В Україні даний показник знизився на 0.9 % в 2017 році та на 12.07 % в 2020 році порівняно з 2016 та 2019 роками відповідно. В той же час, в 2018 році даний показник різко зростає в порівнянні 2017 роком на 20.1 % в Сумській області та 3.5 % в Україні в цілому. Крім того, дана тенденція до зростання спостерігалась і в 2019 році, порівняно з 2018 роком показник захворюваності в Україні зріс на 2.65 %, а в Сумській області – 1.6 %.

При проведенні вікового аналізу захворюваності на рак яєчників встановлено, що пік захворюваності припадає на жінок віком 60–79 років з середнім показником  $34.37 \pm 0.59$ . Крім того, досить високий рівень спостерігається у віковому діапазоні 40–59 років ( $27.67 \pm 0.42$ ). Показник захворюваності для жіночого населення старше 80 років складав  $13.77 \pm 0.71$ . Значно нижчі показники були зареєстровані у вікових діапазонах 20–39 років та до 19 років складаючи  $5.4 \pm 0.25$  та  $0.84 \pm 0.09$  відповідно.



За результатами аналізу розподілу гістологічних типів раку яєчників досліджених зразків Сумського обласного клінічного онкологічного центру було встановлено, що 91% від загальної кількості злоякісних новоутворень яєчників склали саме епітеліально-стромальні пухлини. Серед них, 75 % склали серозні аденокарциноми яєчників. Саме тому основою досліджуваних груп дисертаційної роботи стали серозні аденокарциноми яєчників з наявністю та відсутністю патологічної біомінералізації. Також, було зареєстровано муцинозні та ендометріїдні злоякісні новоутворення яєчників з питомою часткою 12 % та 4 % відповідно. При тому, 9 % від загальної кількості складала сума таких гістологічних типів, як гормон продукуючі та герміногенні злоякісні новоутворення яєчників.

Як правило, пухлини яєчників виявляються на III-IV стадії захворювання, лише в поодиноких випадках діагностуються на I-II стадії [3]. Це в свою чергу, відображається на коефіцієнті п'ятирічної виживаності, який сягає 92 % та 28 % для I-II та III-IV стадії відповідно [18, 20]. Приблизно у 80% жінок із пізньою стадією раку яєчників спостерігається прогресування або рецидив пухлинного процесу. Це призводить до зниження показників працездатності та повноцінності життя жіночого населення, що становить медико-соціальну проблему світового масштабу [21].

На основі проведеного аналізу щодо стадійності пухлинного процесу злоякісних новоутворень яєчників в Сумській області було встановлено, що у 47% зареєстрованих випадків рак яєчників був діагностований на III стадії захворювання. Крім того, на I стадії було встановлено дане захворювання у 36 %, на IV стадії – 12 % та у 5 % – стадія захворювання не визначена.

Насамперед, значне зростання рівня захворюваності на злоякісні новоутворення яєчників в Сумській області взаємопов'язане з вдосконаленням та розширенням діагностичних можливостей. Також, вагомий внесок в діагностику раку яєчників внесло імуногістохімічне дослідження, зростання кількості сучасних апаратів ультразвукової діагностики та комп'ютерної томографії.

Відомо, що при трансвагінальному УЗД чутливість виявлення РЯ складає 85 %, а специфічність – 98.7 %. Однак, даний метод знецінений в ранній діагностиці за рахунок того, що він дозволяє діагностувати пухлинне утворення, але не дозволяє віддиференціювати доброякісний процес чи злоякісний [70].

Онкогенні процеси в поєднанні з сприятливим середовищем є основними факторами пухлинного процесу. Мікрооточення пухлини складається із так званої складної мережі протаногістів, включаючи цитокіни, компоненти позаклітинного матриксу, які взаємодіють з ендотеліальними, імунними клітинами та фібробластами [163]. А також, дана взаємодія відбувається з різними типами специфічних клітин, в залежності від локалізації пухлинного процесу. Ця різноманітність визначає так звані специфічні «ніші», такі як імунні, судинні, кісткові, які безпосередньо залучені до пухлинного росту, інвазивності процесу та метастазування [164].

Епітеліально-мезенхімальний перехід (ЕМП) – це процес під час якого клітини зазнають трансформації від епітеліального до мезенхімального фенотипу [165]. Оскільки, пухлинні клітини набувають здатності до інвазивності та міграції через процеси ЕМП. Таким чином, ЕМП являється передумовою метастазування [166].

Також, метастазування може бути остеотропним за рахунок трансформації між пухлинними клітинами та клітинами кісткової стромы, диференціації мезенхімальних стовбурових клітин у остеобласти та остеобласти (клітини остеобластичного фенотипу). В літературі описаний зв'язок остеотропності метастазів передміхурової залози та грудної залози з патологічною біомінералізацією [167, 168]. Оскільки при раку яєчників також наявна патологічна біомінералізація, то нами було проведено імуногістохімічне дослідження з метою визначення остеобластичного фенотипу пухлинних клітин та метастатичного потенціалу раку яєчників з патологічною біомінералізацією.

При проведенні імуногістохімічного дослідження тканини раку яєчників з та без патологічної біомінералізації для визначення остеобластичного фенотипу пухлинних клітин було застосовано наступну панель маркерів: OPN, OPG, RANKL та SPARC.

OPN є глікофосфопротеїном, який секретується в організмі нормальними остеобластами, гладкими м'язовими та епітеліальними клітинами, а також можуть експресуватися в надмірній кількості пухлинними клітинами в тих чи інших органах, включаючи рак яєчників [169, 170].

Відомо, що OPN може сприяти пухлинному росту в тканині яєчників шляхом активації сигнального шляху PI3K/АКТ/HIF-1 $\alpha$ . Крім того, OPN передає сигнали через CD44 та рецептори інтегрину, тим самим активуючи сигнальні шляхи MEK/ERK та JAK/STAT. Функціонально OPN сприяє метастатичним процесам, проліферації пухлинних клітин, хіміорезистентності, стійкості до променевої терапії та імуносупресії при різних типах раку. При тому, експресія OPN позитивно корелює із стадією захворювання та гістологічними типом [171]. Також, експресія OPN значно збільшує кількість колоній пухлинних клітин в умовах стресу *in vitro* та безпосередньо сприяти пізньому прогресуванню пухлинного процесу *in vivo*, цим самим експресія на етапах метастазування є значно вищою [172, 173].

У нашому дослідженні було встановлено, що середній показник експресії OPN у групі I тканини раку яєчників був вище майже в три рази порівнюючи з групою II, складаючи при цьому  $73.34 \pm 4.25$  та  $26.93 \pm 1.88$  клітин в полі зору діаметром 1 мм відповідно. Встановлено достовірну різницю за критерієм Стьюдента між даними показниками ( $p < 0.001$ ) (рис. 7.1).

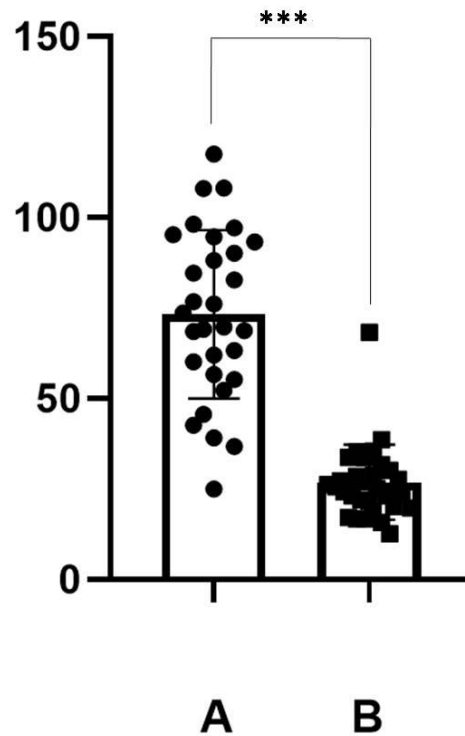


Рисунок 7.1. Імуногістохімічне дослідження експресії OPN у тканині раку яєчників з (A) та без (B) патологічної біомінералізації. 95 % інтервал достовірності – \*\*\* ( $p < 0.001$ ).

OPG є секретованим членом надродини рецепторів TNF (фактор некрозу пухлин). Він може зв'язуватись з рецепторним активатором ліганду NFκB (RANKL) та функціонувати у якості розчинного фактора-приманки для RANKL. У літературі описано, що OPG є фактором виживання, тим самим може блокувати індукований апоптоз пухлинних клітин [174, 175].

Описано випадки раку товстої кишки та передміхурової залози, де рівень OPG у сироватці крові є вищим у пацієнтів на стадіях метастатичного ураження [176]. Це в свою чергу, свідчить про те, що OPG може мати антиапоптичний ефект під час метастатичного процесу. Останні дані, демонструють результати досліджень, які показують, що злякисний асцит може мати вплив безпосередньо на пухлинні клітини, сприяючи їх росту, інвазії та так званому виживанню. Зокрема, асцит у пацієнтів із прогресуючим раком яєчників надає захисну дію проти апоптозу, індукуючи шляхи виживання пухлинних клітин [177, 178]. Крім цього, високі рівні OPG при злякисному асциті були пов'язані з

меншою тривалістю життя без прогресування пухлинного процесу у тканині яєчників [179]. Отже, блокада ендогенного OPG при асциті не впливає на антиапоптичну активність [180]. Ці дані підвищують ймовірність того, що OPG може захищати пухлинні клітини раку яєчників від індукованого апоптозу, а при злякисному асциті бути критичним фактором виживання. У нашому дослідженні при використанні антитіла проти OPG було встановлено, що позитивна реакція в групі I складала  $63.07 \pm 3.52$  клітин в полі зору діаметром 1 мм, а в другій –  $58.57 \pm 3.54$  клітин в полі зору, без достовірної різниці за критерієм Стюдента (рис. 7.2). На основі цих даних, встановлено, що рівень експресії OPG та патологічна біомінералізація не мають безпосереднього впливу одне на одного.

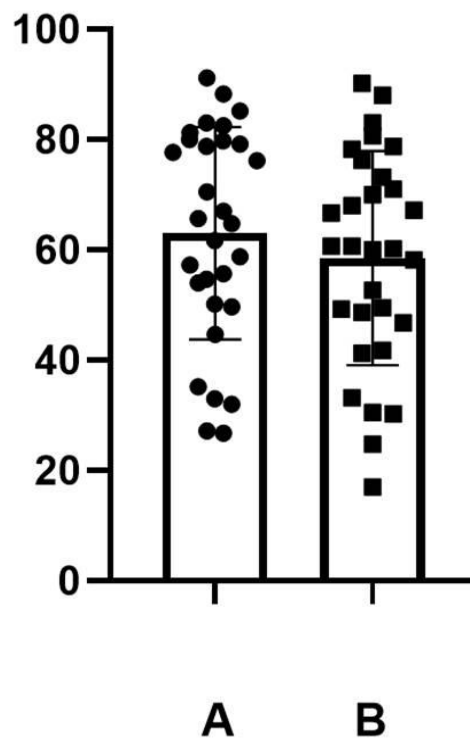


Рисунок 7.2. Імуногістохімічне дослідження експресії OPG у тканині раку яєчників з (A) та без (B) патологічної біомінералізації.

Система RANK/RANKL/OPG відіграє важливу роль як в імунитеті, так і пухлиноутворенні, а експресія пухлинних клітин RANK/RANKL корелює з метастазуванням та безпосередньо з прогресуванням пухлинного процесу [181].

RANKL є ключовим регулятором диференціації та проліферації остеобластів, що експресується остеобластами та остеоцитами в кістковій тканині. У системі RANK/RANKL/OPG безпосередньо RANKL може взаємодіяти з RANK як своїм рецептором та індукувати дозрівання попередників остеобластів [180, 181]. OPG в даній системі відомий як так звана приманка для RANKL, цим самим пригнічуючи взаємодію RANKL – RANK і це в подальшому знаходить своє відображення у блокуванні процесів остеогенезу [181, 182]. Крім того, пухлинні клітини мають здатність вивільняти біоактивні цитокіни для безпосереднього регулювання активності системи RANK/RANKL/OPG цим самим індукувати руйнування кісткової тканини. З іншого боку, встановлено, що RANKL бере участь у міграції, інвазії та проліферації пухлинних клітин [179, 180, 182].

У літературі описані випадки, які свідчать про те, що RANKL опосередковує прогестерон-залежний рак молочної залози, а RANK/RANKL сигналізує про контрольовані мутації *BRCA1* пухлин молочної залози [182]. Sigl та співав. встановили, що генетичне інгібування RANKL у мишей перешкоджає розвитку пухлинного процесу спричиненого мутацією *BRCA1* [183]. Крім того, блокування RANK/RANKL порушує проліферацію пухлинних клітин та розповсюдження пухлинного процесу, що вказує про залучення RANK/RANKL в механізм розвитку генетично продукowanego раку молочної залози [184]. Оскільки, мутації *BRCA1* пов'язані не лише з раком молочної залози, а й з раком яєчників то дані сигнальні взаємоз'язки можуть приймати безпосередню участь в механізмі розвитку РЯ.

При проведенні нашого дослідження було встановлено, що експресія RANKL в першій групі зразків раку яєчників складав  $56.37 \pm 3.37$  та  $60.87 \pm 3.14$  клітин в полі зору діаметром 1 мм для другої групи, без достовірної різниці за критерієм Стьюдента (рис. 7.3).

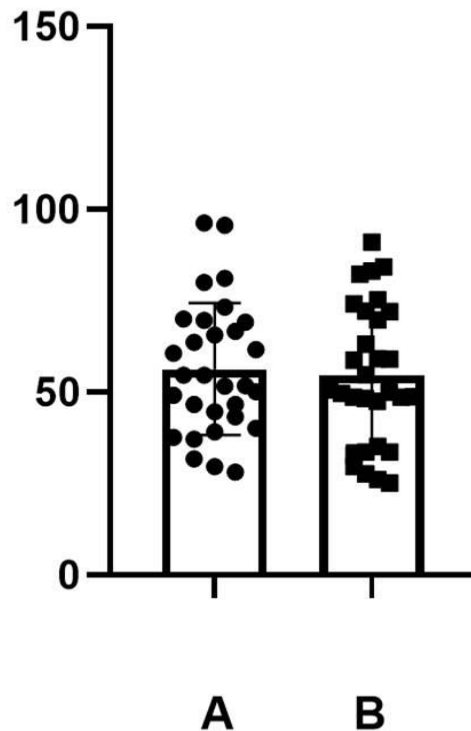


Рисунок 7.3. Імуногістохімічне дослідження експресії RANKL у тканині раку яєчників з (А) та без (В) патологічної біомінералізації.

SPARC є секреторним багатогранним білком, який багатий цистеїном, сильно експресується у пухлинах з високою метастатичною активністю [185]. Даний білок має N- та С-кінцеві домени, які слугують так званою платформою для зв'язування  $\text{Ca}^{2+}$  з низькою та високою спорідненістю відповідно [186]. Також, SPARC сприяє епітеліально-мезенхімальному переходу та метастазуванню в кістки при таких пухлинних процесах, як меланома, гліобластома, рак передміхурової залози та рак молочної залози [187-189]. Крім того, даний білок може діяти як протипухлинний фактор у антиангіогенезі, проапоптозі, інгібуванні клітинної проліферації та зупинці клітинного циклу при злоякісних новоутвореннях яєчників, підшлункової залози, шлунка, колоректального раку та нейробластоми.

SPARC пригнічує активність EGF при раку яєчників та може активувати GSK3  $\beta$ -мішені в адипоцитах, діючи як пухлинний супресор [190]. Злоякісні епітеліальні клітини при карциномах яєчників демонструють знижену імунореактивність SPARC. Це зниження експресії SPARC при пухлинному

процесі пов'язане з епігенетичним глушінням. Внаслідок чого, 68 % карцином яєчників демонструють аномальне метилювання промотору SPARC [185, 191]. Варто відмітити, що зниження рівня даного білка відповідає прогресуванню пухлинного процесу, рак яєчників не є виключенням. Крім того, екзогенне додавання та примусова експресія SPARC послаблюють проліферацію клітин *in vitro* та ріст пухлинних клітин раку яєчників *in vivo* [192].

Bull Phelps та співав. провели експериментальне дослідження на мишачих моделях перитонеального карциноматозу яєчників, в якому SPARC-нульові миші мали зниження рівня виживаності, посилене перитонеальне поширення та збільшення накопичення асцитичної рідини [193]. Також, відомо, що експресія SPARC у клітинах раку яєчників обернено корелює із ступенем злоякісності. Оскільки SPARC пригнічує проліферацію як нормальних, так і пухлинних клітин, але індукує апоптоз лише ракових клітин. Це в свою чергу свідчить про те, що пухлинні клітини стають чутливими до апоптичної активності SPARC під час злоякісної трансформації.

Yiu та співавт. довели, що рецептори SPARC присутні на епітеліальних клітинах яєчника, тим самим їх рівень вище в епітеліальних клітинах порівняно з пухлинними [194].

При проведенні імуногістохімічного дослідження нами було встановлено, що середній показник позитивної реакції в першій досліджуваній групі зразків раку яєчників складав  $48.32 \pm 3.26$  клітин в полі зору діаметром 1 мм. При тому, середній показник другої групи був вищим порівняно з першою групою та складав  $63.19 \pm 3.39$  клітин в полі зору. Крім того, спостерігалась достовірна різниця між даними показниками за критерієм Стьюдента ( $p < 0.01$ ) (рис. 7.4).



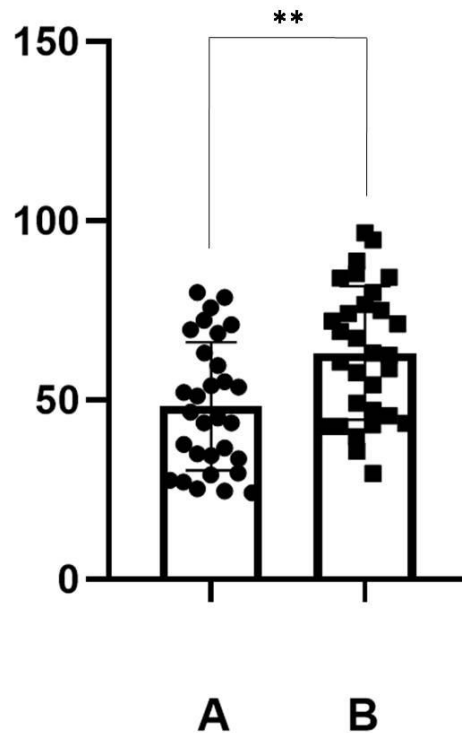


Рисунок 7.4. Імуногістохімічне дослідження експресії SPARC у тканині раку яєчників з (A) та без (B) патологічної біомінералізації. 95 % інтервал достовірності – \*\* ( $p < 0.01$ ).

Отже, при порівнянні результатів ІГХ дослідження з використанням маркерів остеобластичного фенотипу встановлено достовірно вищу експресію OPN ( $p < 0.001$ ) у зразках тканини раку яєчників з патологічною біомінералізацією та нижчу експресію SPARC ( $p < 0.01$ ) в тій же самій групі. Не отримано достовірної різниці за критерієм Ст'юдента між першою та другою досліджуваними групами при використанні антитіл проти OPG та RANKL. Це в свою чергу, свідчить про те, що OPG та RANKL не мають безпосереднього взаємозв'язку з патологічною біомінералізацією. Також, це може бути пов'язано з тим, що патологічна біомінералізація починає свій розвиток на ранніх етапах канцерогенезу, а OPG та RANKL взаємодіючи між собою на більших пізніх етапах розвитку пухлинного процесу, а саме етапах метастазування.

Також, при проведенні ІГХ дослідження було використано такі маркери як, Casp3, C68 та CD163.

Casp3 (каспаза-3) – ключовий фермент апоптичного шляху, який відіграє безпосередню роль у пухлинному процесі та його прогресуванні [195, 196]. Однак, дослідження Feng та співав. показали, що Casp3 сприяє пухлинному росту шляхом створення мікрооточення, яке приймає участь в ангіогенезі [197]. Zhou та співав. описали випадки раку товстої кишки, в яких Casp3 відіграв невід’ємну роль в інвазії та метастазуванні пухлинита може служити потенційною мішенню для терапії пухлинних процесів. Прискорення росту відбувається за рахунок того, що Casp3 опосередковує вироблення простагладину E, який є регулятором росту [198]. Також, Casp3 може сприяти переходу епітелію в мезенхіму (EMT). EMT відіграє важливу роль в деградації базальної мембрани, цим самим сприяти клітинній міграції та виживаності клітин під час інвазії в так званому новому середовищі [199]. Відомо, що під час апоптозу розщеплена Casp3 може активувати кальцій-незалежну фосфоліпази A<sub>2</sub>, стимулюючи тим самим вивільнення арахідонової кислоти (AA) та активує продукування простагландину E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) [200]. Цим самим, апоптичні пухлинні клітини продукують мікрооточення, яке збагачене PGE<sub>2</sub>, через метаболічний шлях AA, який в свою чергу опосередкований каспазою-3. Це може призвести до аномальної активації фосфорильованої кінази фокальної адгезії (ФАК), що в решті-решт прискорює репопуляцію клітин раку яєчників SKOV3 [201]. Каспаза добре відома своєю безпосередньою роллю в апоптозі, але нещодавно була виявлена її неапоптична роль. Як згадувалось вище, каспаза-3 посилює процеси ангіогенезу за рахунок підвищення експресії проангіогенних генів та шляхом активації сигнальних шляхів, які впливають на ендотеліальні клітини [202].

При проведенні імуногістохімічного дослідження нами було встановлено що, середній показник експресії Casp3 в досліджуваній групі раку яєчників з патологічною біомінералізацією складав  $57.31 \pm 2.97$  клітин в полі зору діаметром 1 мм та без патологічної біомінералізації –  $47.07 \pm 2.99$  клітин в полі зору, з достовірною різницею за критерієм Стьюдента ( $p < 0.05$ ) (рис.7.5).

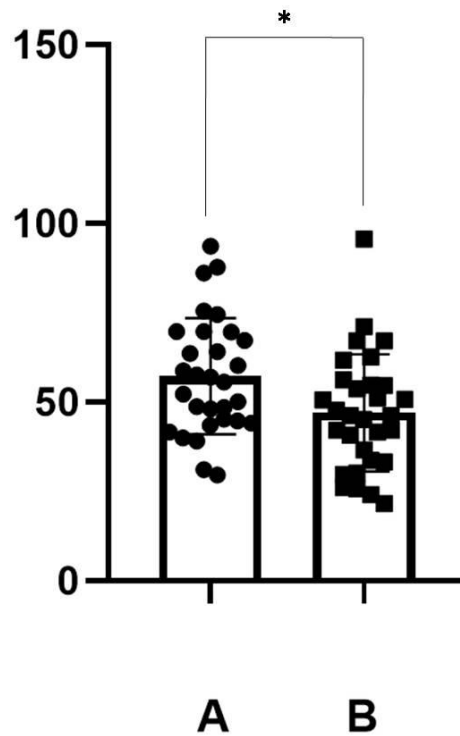


Рисунок 7.5. Імуногістохімічне дослідження експресії Casp3 у тканині раку яєчників з (А) та без (В) патологічної біомінералізації. 95 % інтервал достовірності – \* ( $p < 0.05$ ).

Вважається, що пухлинне мікрооточення відіграє важливу роль у прогресуванні раку яєчників. Одним із найважливіших компонентів якого є пухлинно-асоційовані макрофаги (ПАМ). Відомо, що ПАМ є важливим фактором росту пухлини та прогресування пухлинного процесу [203]. За фенотипом макрофаги широко класифікуються як прозапальні М1 та протизапальні М2 на основі цитокінів та хемокінів, які вони безпосередньо і продукують. Пухлинне мікрооточення пов'язане з макрофагами фенотипу М2, які пригнічують навколишнє імунне середовище, цим самим допомагаючи пухлинним клітинам уникати так званого імунного націлювання та забезпечують підтримку пухлинного росту та метастатичного процесу. Варто зауважити, що М2-подібні макрофаги характеризуються експресією, як CD68, так і CD163 [204, 205]. В той же час, макрофаги М1 забезпечують створення імунної відповіді проти пухлинного процесу, цим самим взаємопов'язані із сприятливим прогнозом. При цьому, М1-подібні макрофаги характеризуються

експресією CD68 та переважно виробляють оксид азоту, який є вільним радикальним газом, а він в свою чергу є безпосередньо цитотоксичним як для пухлинних клітин та для різних патогенів [204]. На клітинному рівні ПАМ мають властивість функціональній пластичності, тобто можуть приймати різноманітні про- та / або протизапальні функції залежно від мікрооточення та взаємопов'язаних стимулів [206]. Цікавим фактом є те, що взаємодія клітин раку яєчників та ПАМ обумовлена складною мережею цитокінів, для якої характерне взаємне підсилення. Тобто, пухлинні клітини яєчників рекрутують макрофаги через СС-хемокін-ліганд 2 / моноцитарний хемоаттрактантний білок-1 та здатні поляризувати макрофаги, цим самим індукуючи фенотип M2 [207].

Середній показник експресії CD68 в досліджуваних зразках раку яєчників з патологічною біомінералізацією склав  $52.44 \pm 3.37$  клітин в полі зору діаметром 1 мм та без патологічної біомінералізації рівень експресії сягав  $60.87 \pm 3.14$  клітин в полі зору, без достовірної різниці за критерієм Стьюдента (рис.7.6).

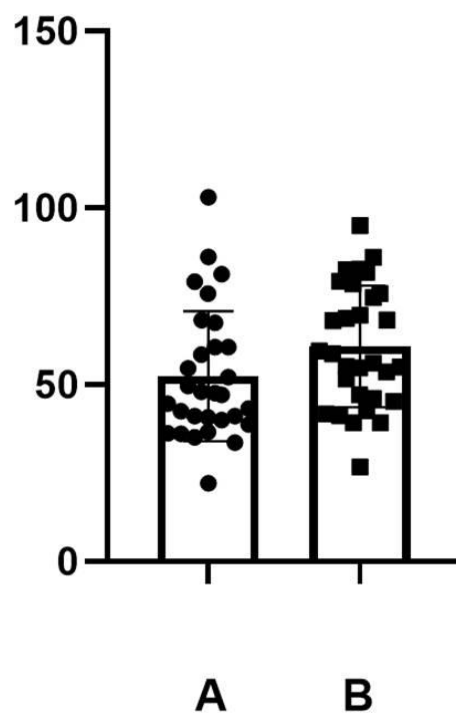
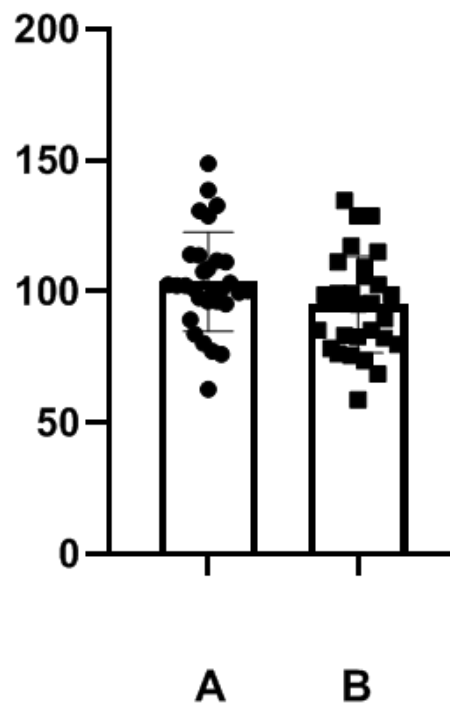


Рисунок 7.6. Імуногістохімічне дослідження експресії CD68 у тканині раку яєчників з (А) та без (В) патологічної біомінералізації.

Експресія CD163 в досліджуваній групі раку яєчників з патологічною біомінералізацією складала  $103.71 \pm 3.45$  клітин в полі зору діаметром 1 мм, а для групи без патологічної біомінералізації позитивна реакція встановлена у  $95.02 \pm 3.36$  клітин в полі зору, без достовірної різниці за критерієм Стьюдента (рис. 7.7).



*Рисунок 7.7. Імуногістохімічне дослідження експресії CD163 у тканині раку яєчників з (А) та без (В) патологічної біомінералізації.*

При проведенні дисертаційного дослідження з використанням ультразвукової діагностики при раку яєчників виявлені біомінеральні включення, які були представлені у вигляді поодиноких гіперехогенних утворень. Патологічні біомінеральні утворення мали округлу форму, гладенькі краї та чіткі контури. За ехоструктурою вони були однорідні з відсутніми акустичними тінями. За умов наявності технічних засобів з роздільною здатністю виявляються біомінеральні депозити, які відповідають 2000 мкм. За повідомленнями наукових джерел декларується можливість виявлення

кальцифікатів від 200 мкм. Також, відомо, що при комп'ютерній томографії виявляються біомінерали 1000 мкм і більше. Інтраваскулярна ультразвукова діагностика дозволяє візуалізувати біомінеральні включення більше 100 мкм, а оптична комп'ютерна томографія – 10-20 мкм та більше. Shioi та співав. встановили, що деякі біомінерали можуть бути рентген-негативними [81]. Це в свою чергу, безпосередньо залежить від складу біомінеральних включень, а також від їх зрілості та структури.

ПБМ є однією з клінічних особливостей раку яєчників та представлений у вигляді кальцифікації капсули, стромы пухлинної тканини та псаммомних тілець [76]. У деяких випадках ріст пухлини у вигляді вузла спричинює утворення фіброзної капсули, яка може кальцифікуватися. Проте такі випадки є рідкісними у рутинній діагностичній практиці патоморфологів. З іншого боку, ПБМ стромы як пухлини, так і прилеглої тканини яєчника є доволі частим спостереженням. Найбільш частими проявами біомінералізації є утворення округлих кальцифікованих утворень («калькосферитів») без наявності шаруватої будови та грубодисперсної кальцифікації сполучнотканинних структур без чіткої організації [208]. Так звані калькосферити часто виявляються у прилеглій не пухлинній тканині яєчника.

ПТ мають пластинчасту, мінералізовану структуру та представлені у вигляді кальцинованих кіл, утворюючись на ранніх етапах канцерогенезу [13, 78]. Наявність ПТ при серозних карциномах яєчників слугує достовірною патогномонічною ознакою в діагностиці та виявляється як за допомогою інструментально-діагностичних методів дослідження, таких як ультразвукова діагностика, комп'ютерна та магнітно-резонансна томографія, так і при гістологічному аналізі [79, 80]. Саме тому, ми зосередили свою увагу на дослідженні ПТ.

В той же час, аналіз морфометричних ознак біомінералів продемонстрував коливання розмірів ПТ від 12.6 до 493.7 мкм. За своєю будовою ПТ склалися з міжпластинчастого шару та ламел, розташовуючи у послідовному порядку (рис. 7.8).

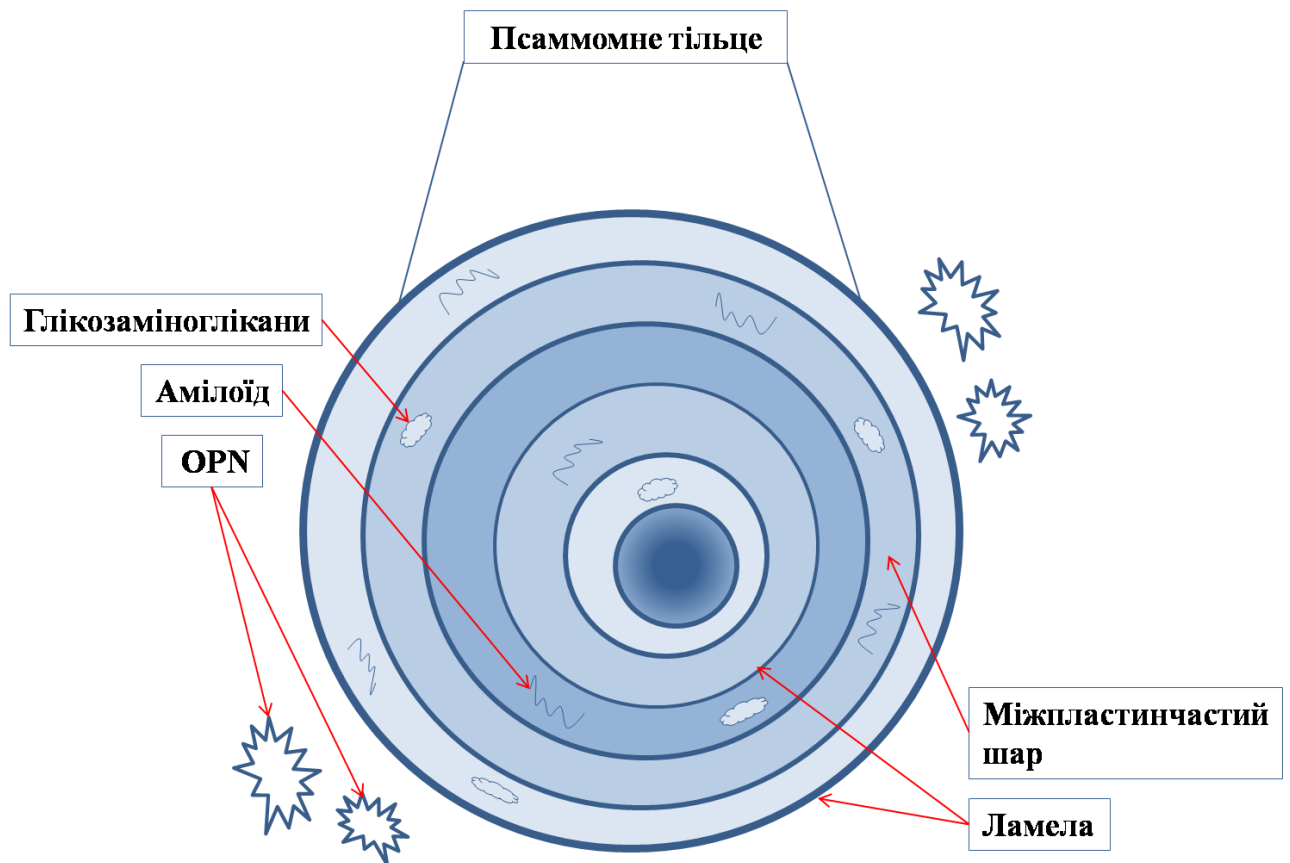


Рисунок 7.8. Схематичне зображення структури псаммомного тільця.

Встановлено, що товщина пластинчастого шару має прямий сильний кореляційний зв'язок з розмірами ПТ ( $r = 0.79$ ;  $p < 0.001$ ), що може свідчити про етапність формування даних тілець. В той же час, товщина ламел має дуже слабкий кореляційний зв'язок з розмірами ПТ ( $r = 0.1$ ;  $p > 0.05$ ). Товщина ламел та пластинчастого шару також має дуже слабкий кореляційний зв'язок ( $r = 0.08$ ;  $p > 0.05$ ).

За результатами гістохімічного та імуногістохімічного досліджень нами було встановлено наявність у міжпластинчастому шарі депозитів глікозаміногліканів та відкладення фібрилярного компоненту (ОС-фібрили), близького до амілоїдної структури. Необхідно відмітити «налипання» білку OPN на поверхні біомінеральних депозитів гідроксиапатитної природи, у тому числі і ПТ (рис. 7.8).

У ході загальної оцінки усього спектру ПБМ серозних аденокарцином яєчника за допомогою гістохімічних методів дослідження, таких як забарвлення за методом фон Косса та алізариновим червоним S було підтверджено

присутність сполук кальцію, переважно у вигляді кальцію фосфату в складі даних біомінералів. Також, градація кольорів забарвлення та інтенсивність накопичення барвника характеризує про різну елементну складову та візуалізує структурні особливості будови біомінеральних депозитів. Структурні та елементні особливості будови патологічних біомінералів ще раз підкреслює використання PAS-реакції, так як даний метод демонструє присутність глікопротеїнів, фосфоліпідів, полісахаридів та глікозамінокліканів, а забарвлення біомінералів ідентичне із методом фон Косса, при якому більш виражене накопичення барвника в ядрі депозиту із зниженням до периферії, так зване градієнтне забарвлення.

Однак, зовсім протилежна картина порівняно із фарбуванням за алізариним червоним S, де накопичення барвника більш інтенсивне на периферії, тобто оболонці біомінералу. Це в свою чергу свідчить, про наявність сполук кальцію, солей кальцій фосфату, глікопротеїнів та глікозаміногліканів в складі мінеральних включень та особливості їх будови. Враховуючи інтенсивність забарвлення, структурні особливості будови та види кальцифікуючих утворень встановлено, що при таких видах кальцифікації, як кальцифікація капсули та пухлинних вузлів основною складовою яких є сполуки кальцію. На основі результатів дисертаційної роботи було розроблено алгоритм діагностичний алгоритм дослідження зразків раку яєчників з патологічною біомінералізацією (рис. 7.9).

Проте у складі пухлинної тканини яєчників спостерігалась невелика кількість фон Косс-негативних біомінеральних утворень. Подальше дослідження мінералізованої тканини РЯ методами прикладного матеріалознавства (рентген-дифракція, ПЕМ з ЕД) встановило наявність слідів присутності фази кальциту, про що раніше не повідомлялося. Таким чином, завдяки точним фізико-хімічним методам дослідження ПБМ яєчників вперше вдалося встановити присутність кальциту в складі біомінеральних депозитів цього органу. Очевидно, що утворення додаткової фази кальцифікату потребує



особливих метаболічних умов, включаючи рН, наявність достатньої кількості фосфатів та інше.

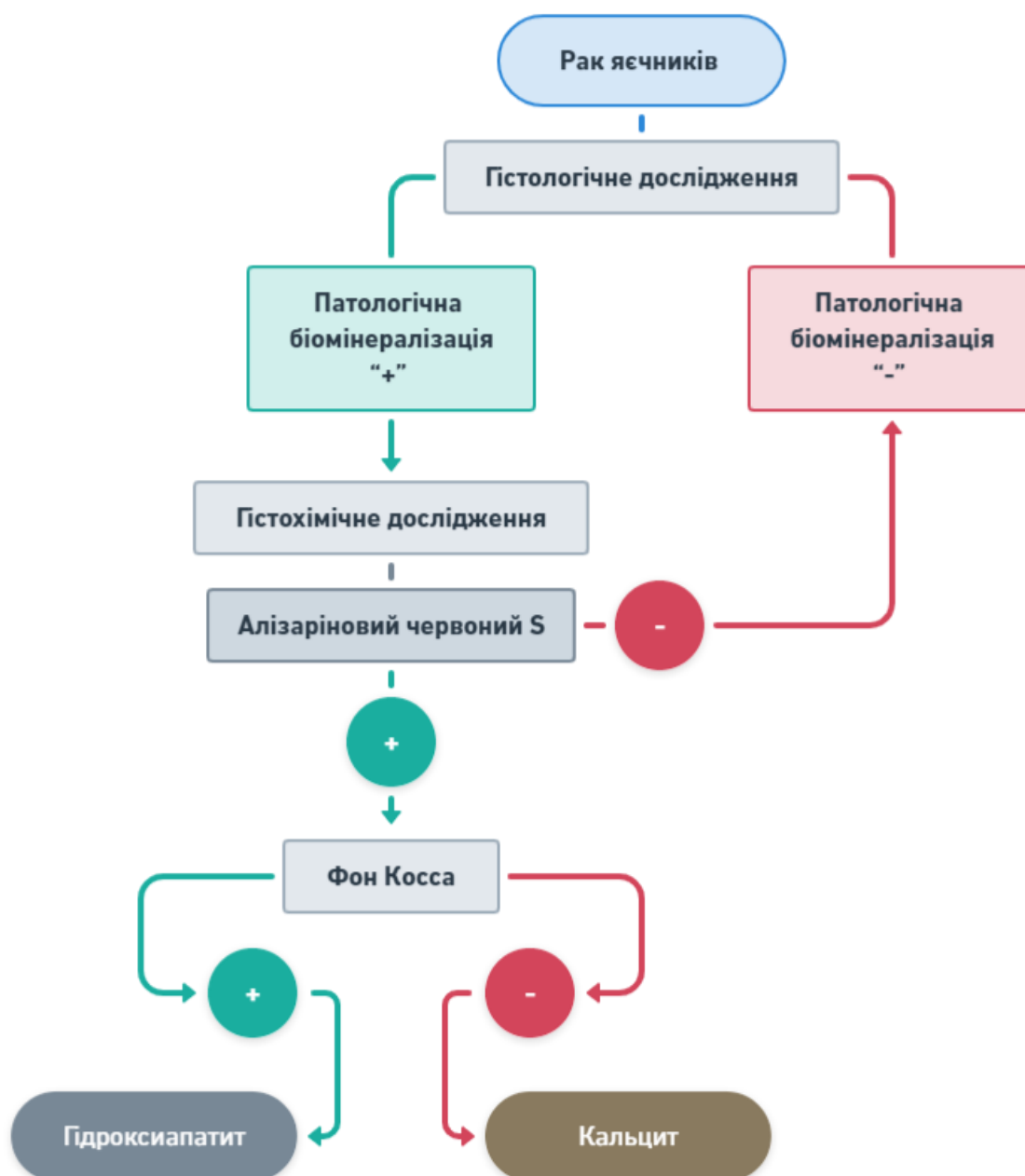


Рисунок 7.9. Діагностичний алгоритм дослідження зразків раку яєчників з патологічною біомінералізацією.

Враховуючи те, що рання діагностика є одним з найважливіших факторів успішного лікування РЯ та й інших онкопатологій також, існує безпосередня потреба в надійних біомаркерах та діагностичних критеріях для виявлення

злякисності процесу в організмі [209]. Оскільки пухлинні клітини характеризуються істотними змінами в їх метаболізмі, то це має відображення на макро- та мікроелементному складі [210].

Мікроелементи включаючи вітаміни та мінерали є необхідними для людського організму в дуже малих концентраціях. Вони відіграють вирішальне значення для ряду важливих функцій, таких як ріст, розвиток та запобігання тих чи інших захворювань [211]. Однак роль мікроелементів у розвитку раку яєчників на сьогодні залишається неясною. У літературі, дані про циркулюючі концентрації мінералів і вітамінів, що мають вплив на розвиток раку яєчників загалом обмежені. Однак, винятком є вітамін D, дослідження клітинного механізму якого при раку яєчників показали, що вітамін D відіграє вирішальну роль у протипухлинній активності, регулюючи клітинну проліферацію та метаболізм через геномні шляхи передачі сигналів [212].

Роль мікроелементів в онкогенезі раку яєчників є предметом інтенсивних досліджень. Оскільки, результати описаних даних в літературі залишаються непереконливими. Ми провели хімічний аналіз досліджуваних зразків групи I та II на виявлення таких мікроелементів, як Zn, Cu, Fe та Mg.

Цинк (Zn) та мідь (Cu) є основними компонентами біологічних структур. Однак, у високих концентраціях вони можуть бути токсичними для організму.

Zn – мікроелемент, який відіграє роль у зростанні, диференціації та апоптозі клітин [213]. Також бере участь в імунних реакціях, окисному стресі. Низький рівень Zn знижує цитотоксичність і активність Т-кілерів. Основним завданням яких є пошук патогенів та пухлинних клітин в організмі знищувати їх, при цьому не пошкоджуючи здорові тканини [214]. Оскільки, цитотоксичні лімфоцити розпізнають пухлинні клітини через взаємодію антиген-розпізнавального рецептору (TRC) на Т-клітині з специфічним олігопептидом. Зміни концентрації Zn впливають на набутий та вроджений імунітет. Це відображається на механізмах протипухлинної активності імунної системи [215]. При процесах канцерогенезу антиоксиданті властивості Zn сприяють пригніченню пухлинного росту. Zn підвищує адгезію лейкоцитів до ендотелію, а

хелатування іонів Zn помітно знижує їх активацію. Також, відомо, що надлишок Zn може бути небезпечним через його імуносупресивну дію. У високих концентраціях Zn може проявляти імуносупресивний ефект шляхом пригнічення функції лімфоцитів та продукції IFN- $\gamma$  [213, 215].

Мідь є поживною мінеральною речовиною, яка бере участь у проліферації клітин. Окислювально-відновна властивість міді з одного боку є корисною, а з іншого потенційно токсичною для клітини. Cu (II) та Cu (I) є двома фізіологічно відповідними ступенями окислення міді, крім того Cu (I) вважається переважаючою формою у відновлювальному середовищі цитозолу клітини [216]. Мідь є необхідним кофактором для ферментів, які опосередковують низку основних клітинних функцій, зокрема дихання мітохондрій, антиоксидантний захист та біосинтез гормонів, але в той же час порушення регуляції запасів Cu може викликати окислюваний стрес та цитотоксичність. Оскільки, рівень міді є регульованим то його дисбаланс може сприяти розвитку та прогресуванню пухлинних процесів [216, 217].

Cu має проангіогенні властивості та індукує міграцію ендотеліальних клітин на ранніх стадіях ангіогенезу [217]. Це прямо пов'язано із ростом, інвазією та метастазуванням злоякісних пухлин. Адже, ангіогенез є невід'ємною частиною пухлинного процесу [218]. Відомо, що співвідношення Cu/Zn був запропонований як маркер раку яєчників. Дана модель використовувалась для прогнозування даної патології [217, 218]. При цьому рівень Cu був значно вищим відносно Zn та свідчив про несприятливий прогноз.

У нашому дослідженні в групі 1 рівень Zn був нижчим, а рівень Cu вище відносно групи 2. При цьому співвідношення Cu/Zn у групі I та групі II складало 0.13 та 0.007 відповідно. Однак рівень Zn в обох групах перевищував рівень Cu, що не відповідає прогностичній моделі. Отже, на основі даної моделі, кальцифікація не впливає на прогноз раку яєчників. Однак, зниження рівня Zn на 41.83 % в групі I може свідчити про схильність пухлинних клітин до апоптозу, цим самим пригнічуючи пухлинний ріст.

Залізо (Fe) відіграє важливу роль у таких клітинних процесах, як клітинне дихання, енергетичний обмін, ДНК реплікації, синтезу ДНК та нуклеїнових кислот, а також забезпечує зазізозалежну передачу сигналів. Однак, незважаючи на те, що Fe є необхідним для нормальної фізіологічної функції людського організму, воно також має токсичні властивості. Токсичність проявляється за рахунок продукування великої кількості вільних радикалів за умови наявності перекису водню. За рахунок взаємодії двовалентного заліза з перекисом водню, відбувається окислення заліза до трьохвалентного, утворюючи при цьому гідроксильні радикали [219]. Гідроксильний радикал є одним з найважливіших окислювачів в організмі людини, який може призвести до перекисного окислення та апоптозу, атакуючи при цьому білки, жири, вуглеводи та нуклеїнові кислоти. Крім цього, надмірна кількість вільних радикалів в організмі людини може призводити до пошкодження клітин, тканин та органів в цілому. Даний процес тісно пов'язаний із виникненням пухлинного процесу. Встановлено, що надлишок Fe сприяє ініціації пухлини та її росту [219, 220]. Також посилює не лише проліферацію, а й інвазію та метастазування. Fe сприяє інвазивності процесу через індукцію IL-6 [221]. Ми встановили, що рівень Fe у групі I на 91.77 % вище порівняно з групою II. Це може свідчити, що все-таки кальцифікація може мати вплив на процеси метастазування та несприятливість пухлинного процесу в цілому.

Низький рівень магнію (Mg) підвищує вміст активних форм кисню, які мутують ДНК, а отже породжують генетичну нестабільність [222]. Відомо, що дефіцит Mg затримує ріст первинної пухлини, але посилює метастазування [223]. Гіпомагніємія прогнозує зниження виживаності пацієнтів із прогресуючим раком яєчників [224]. У нашому дослідженні рівень Mg в групі I на 52.17 % вище порівняно із групою II. Це може свідчити, що кальцифікація приймає участь у метастазуванні РЯ.

Отже, враховуючи елементний склад було встановлено, що кожен кальцифікат має свої структурні особливості, які можуть бути використані в діагностиці та прогнозі РЯ. Різний рівень мікроелементів у кальцифікатах РЯ і

навколишній тканині може бути обумовлений особливостями метаболізму пухлини та реактивністю тканин органу.

Останнім часом, патологічна біомінералізація є все більше діагностованим феноменом. Очевидно, що вона має безпосередній зв'язок з онкопатологією та є її невід'ємною складовою. Необхідне розуміння наявності як органічних, так і неорганічних компонентів в структурному складі біомінеральних включень для повноцінного розуміння механізму патологічного процесу. Вивчення фізико-хімічних властивостей, таких як склад, кристалічність, фазовий склад та морфологія мінералів, дозволить аргументувати те, що різні механізми потенційно можуть відповідати за різні механізми формування тих чи інших патологічних біомінералів при різних захворюваннях [82].

Оскільки, утворення та перетворення патологічних біомінералів у біологічній системі є доволі складним механізмом. Це пов'язано із залученням до процесу мінералізації різних білків та клітинних елементів, які сприяють утворенню специфічних мінеральних фаз [225, 226]. Наприклад, присутність кальцію в складі біомінералу, вказує на те, що іони кальцію містяться у великій кількості в позаклітинному матриксі, в якому він безпосередньо і утворюється, або на те, що він виділяється самим клітинами. Ці клітини можуть бути як правило остеобластами, або макрофагами, які містять велику кількість кальцію чи навіть специфічними клітинними органелами, такими як екзосоми та мікровезикули [227]. Крім того, такі характеристики, як кристалічність можуть вказувати на біохімічні шляхи, які ведуть до утворення самих біомінералів [228]. Наприклад, біомінеральні утворення з монокристалічністю, зазвичай є продуктом механізмів, які безпосередньо керовані специфічними білками та здатні контролювати кристалічність.

Отже, дійсно тип кристалічності дає так звану підказку про природу самих білків, які беруть участь у формуванні біомінералів. Цікавим є те, що кристалічність при патологічній біомінералізації з часом може змінюватись [229-231]. Проведено безліч досліджень з визначення фізико-хімічного складу біомінеральних утворень різних локалізацій та при різних патологіях. Відомо,

що кальцифікати судин в своєму основному елементному складі містять частинки кальцію, які дифрагують як єдиний кристал [232]. Кальцифікати при раку молочної залози можуть бути двох типів та складаються з оскалату кальцію або апатиту, маючи при цьому зовсім різний механізм утворення та роль при даному захворюванні [233]. Патологічні біомінерали, які зустрічаються при патологіях головного мозку в своєму складі містять крім кальцію такі елементи, як залізо, марганець, магній, цинк та алюміній [234, 235].

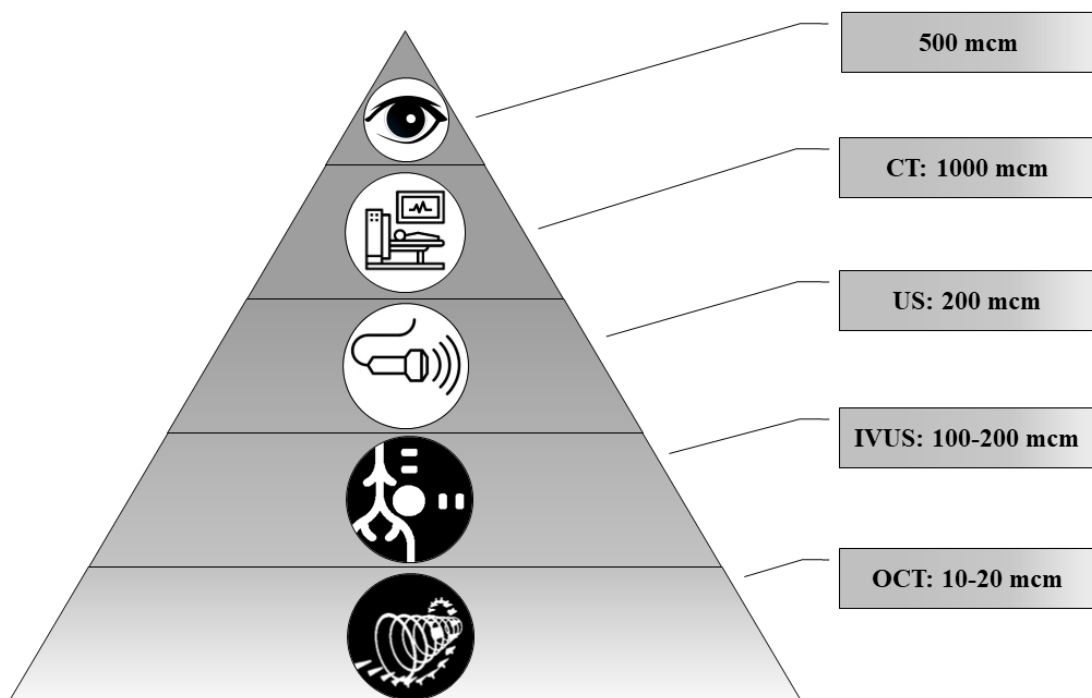
В нашому дослідженні фізико-хімічного складу патологічних біомінералів при раку яєчників з використанням таких методів дослідження як сканувальна та просвітлювальна електронна мікроскопія та рентгенівська дифракція. При аналізі результатів даних методів дослідження встановлено, що основими лініями в ЕДС спектрах досліджуваних зразків були кальцій та фосфор. Співвідношення яких, відповідали характерним ознаками гідроксиapatиту. Однак зустрічались випадки з наявними не вираженими лініями кисню, карбону, магнію та натрію. За допомогою карт розподілу елементів встановлено, що в місцях локалізації патологічних біомінералів наявні кальцій та фосфор та поодинокі накопичення кисню. ПЕМ продемонструвало, що кристали апатиту здебільшого являються полідисперсними, але зустрічаються і монодисперсні. На основі картини ЕД встановлено полікристалічність досліджуваних зразків. Крім того, за допомогою рентгенівської дифракції встановлено, що всі патологічні біомінерали представлені апатитом кальцію з різним рівнем кристалічності.

Отже, це ще раз підкреслює те, що різні мінерали можуть бути виявлені при тій чи іншій патології і не обов'язково мати ідентичний механізм утворення.

Сьогодні застосовується цілий ряд рутинних та високотехнологічних неінвазивних діагностичних методів, таких як ультразвукове дослідження, комп'ютерна томографія, магнітно-резонансна томографія, інтраваскулярне ультразвукове дослідження, оптична когерентна томографія, позитронна емісійна томографія. Технічний прогрес дає змогу проводити діагностику все

дрібніших об'єктів. Проте ці діагностичні методи мають різну роздільну здатність (рис. 7.10).

Так, відомо, що за допомогою комп'ютерної томографії (КТ) виявляються патологічні депозити від 1000 мкм. Внутрішньосудинне ультразвукове дослідження (ВСУЗД) дозволяє діагностувати кальцифікати із роздільною здатністю 100-200 мкм. А найбільш високотехнологічним та інформативним методом є оптична когерентна томографія (ОКТ), роздільна здатність якого складає 10-20 мкм.



*Рисунок 7.10. Роздільна здатність діагностичних методів, які використовуються у виявленні біомінеральних утворень. СТ – комп'ютерна томографія, US – ультразвукова діагностика, IVUS – інтраваскулярне ультразвукове дослідження, ОСТ – оптична комп'ютерна томографія.*

У дослідженні Shioі та співавт. показано, що частина конкрементів можуть бути рентген-негативними [81]. Це очевидно залежить як від складу патологічних біомінералів, так і від ступеню зрілості біомінералу та його структури. Дані встановлені за допомогою трансмісійної електронної

мікроскопії (ТЕМ) та електронної мікродифракції (ЕД), демонструють структурні та морфологічні особливості кристалів апатиту яєчників, які не виявляються іншими методами. Тому розробка діагностичного методу на основі ТЕМ з ЕД (або іншої високороздільної методики) у перспективі могло б покращити ранню діагностику злоякісних пухлин яєчників.



## ВИСНОВКИ

Незважаючи на вагоме значення злоякісних пухлин яєчників у структурі смертності і захворюваності жінок, станом на сьогодні відсутні дані щодо значення патологічної біомінералізації для діагностики та розвитку ускладнень. У дисертаційній роботі вирішується актуальне завдання патологічної анатомії, що відноситься до оптимізації патоморфологічної діагностики та оцінки прогнозу перебігу раку яєчників шляхом виявлення патоморфологічних особливостей серозної аденокарциноми яєчників з ознаками біомінералізації, з'ясування патогенетичних особливостей канцерогенезу за умов присутності кальцифікатів у пухлині.

1. За результатами поширеності РЯ в Україні у період 2014–2021 років найвищий рівень захворюваності спостерігається в 2014–2015 та 2019 роках (11.5 та 11.6 випадків на 100 тис. жіночого населення відповідно). В той же час, найнижчий – в 2020 році (10.2 випадків на 100 тис. жіночого населення). Показники захворюваності на РЯ у Сумській області перевищують загальнодержавний рівень, за винятком 2017 та 2020 років. За результатами вікового аналізу хворих на РЯ встановлено, що найвищі показники захворюваності відмічаються серед жінок у віці 60–79 років ( $34.37 \pm 0.59$ ). За результатами аналізу щодо стадійності пухлинного процесу РЯ в Сумській області було встановлено, що у 47 % рак яєчників діагностовано саме на III стадії захворювання, у 36 % – I-II стадія, у 12 % – IV стадія та у 5 % – стадію не визначено.

На зростання кількості виявлених випадків РЯ в Сумській області впливають в першу чергу вдосконалення та покращення рівня якості клінічної та морфологічної діагностики. Найбільш часте виявлення РЯ у віковій категорії 60-79 років та на III стадії захворювання обумовлене неефективністю ранніх скринінгових методів діагностики.

2. За результатами імуногістохімічного дослідження остеобластичних маркерів раку яєчників з патологічною біомінералізацією було встановлено, що рівень експресії OPN відповідав  $73.34 \pm 4.25$ , OPG –  $63.07 \pm 3.52$ , RANKL –  $56.37 \pm 3.30$  та SPARC –  $48.32 \pm 3.26$ , в той час як зразки раку яєчників без патологічної біомінералізації мали експресію OPN  $26.93 \pm 1.88$ , ( $p < 0.001$ ), OPG –  $58.57 \pm 3.54$ ), RANKL –  $54.52 \pm 3.49$  ( $p > 0.05$ ) та SPARC –  $63.19 \pm 3.39$ , ( $p < 0.01$ ). Експресія CD68 ( $52.44 \pm 3.37$ ) та CD163-позитивних клітин ( $103.71 \pm 3.45$ ) у зразках РЯ з наявністю патологічної біомінералізації та у зразках без патологічної біомінералізації CD68 ( $60.87 \pm 3.14$ ), ( $p > 0.05$ ). Встановлено достовірну різницю імуногістохімічної експресії Casp3 між групами зразків РЯ з наявністю кальцифікатів ( $57.31 \pm 2.97$ ) та їх відсутності ( $47.07 \pm 2.99$ ), ( $p < 0.05$ ).

3. Співвідношення Ca/P патологічних біомінералів раку яєчників відповідають гідроксиапатиту. Також серед фазового складу кальцифікатів раку яєчників за допомогою ПЕМ з ЕД вперше було виявлено в невеликій кількості кальциту. Біомінеральні депозити являють собою кристали від 40 до 50 нм, в оточенні дрібних кристалічних часточок (5 – 15 нм). Дані кристали є полідисперсними та характеризуються полікристалічністю.

4. При порівнянні хімічного складу патологічних біомінералів (група I) та оточуючої пухлинної тканини (група II) раку яєчників встановлено, що основним елементом в першій групі було залізо (Fe), а другої групи був магній (Mg).

5. Оскільки у зразках групи раку яєчників з патологічною біомінералізацією встановлено достовірно вищу експресію маркерів OPN ( $p < 0.001$ ), Casp3 ( $p < 0.05$ ) та нижчу SPARC ( $p < 0.01$ ) зазначені результати можуть вказувати як на важливість механізму остеобластичної трансформації клітин пухлини та мікрооточення, так і на помітну роль дистрофічних змін у формуванні патологічних біомінералів.

## ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Для виявлення та ідентифікації типу біомінеральних утворень РЯ рекомендовано додаткове використання гістохімічних методик забарвлення зразків — забарвлення алізариновим червоним та методом фон Косса.
2. Запропонований діагностичний алгоритм з урахуванням якісного складу кальцифікатів РЯ, дозволить покращити діагностику та оцінити прогноз перебігу цієї хвороби.
3. Дослідження впливу псаммомних тілець РЯ на біологічну поведінку пухлини дозволяє використовувати їх як діагностичний і прогностичний фактор перебігу хвороби, персоніфіковано підходити до лікування пацієток.

## ПРИМІТКИ

Результати дисертаційної роботи були опубліковані у співавторстві з Романом Андрійовичем Москаленком, Сергієм Миколавичем Данильченком та Артемом Михайловичем Піддубним.

Хочу висловити найщирішу вдячність науковому керівнику д.мед.н, професору Москаленку Роману Андрійовичу за безпосередню участь у виборі теми дисертаційного дослідження, безперервну підтримку та допомогу на етапах проведення досліджень. Також, безмежна подяка за підтримку у втіленні всіх ідей у ході дисертаційної роботи, порад, мотивацію та заохочення до наукової діяльності. Окрема вдячність завідувачу відділу радіаційної біофізики Інституту прикладної фізики Національної академії наук України, к.фіз.-мат.н. Данильченку Сергію Миколайовичу за можливість та допомогу в проведенні фізико-хімічного аналізу та дослідження фазового складу патологічних біомінералів раку яєчників. Також, хотілось би висловити слова вдячності Піддубному Артему Михайловичу за допомогу у статистичній обробці даних та графічному дизайні отриманих даних.

Москаленко Роман Андрійович – запропонував проведення комплексного дослідження патологічних біомінералів раку яєчників у ході дисертаційної роботи, сформулював мету та встановив задачі досліджень. Також, Роман Андрійович приймав безпосередню участь у проведенні морфометричних та морфологічних досліджень, підготовці наукових статей та обговоренні результатів.

Данильченко Сергій Миколайович – приймав участь у проведенні фізико-хімічних досліджень та аналізі отриманих результатів. А також, підготовці наукових статей до публікації.

А.М. Піддубний – приймав участь у статистичній обробці даних, створенні графіків та панелей отриманих даних. А також підготовці наукових статей до публікації.

Щира вдячність колективу кафедри патологічної анатомії Навчально-наукового медичного інституту Сумського державного університету за моральну підтримку, допомогу, терпіння та активну участь у обговоренні результатів дисертаційного дослідження на наукових семінарах.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Cho KR, Shih IeM. Ovarian cancer. *Annu Rev Pathol.* 2009;4:287-313. doi: 10.1146/annurev.pathol.4.110807.092246. PMID: 18842102; PMCID: PMC2679364.
2. Momenimovahed Z, Tiznobaik A, Taheri S, Salehiniya H. Ovarian cancer in the world: epidemiology and risk factors. *Int J Womens Health.* 2019 Apr 30;11:287-299. doi: 10.2147/IJWH.S197604.
3. Lengyel E. Ovarian cancer development and metastasis. *Am J Pathol.* 2010 Sep;177(3):1053-64. doi: 10.2353/ajpath.2010.100105. Epub 2010 Jul 22. PMID: 20651229; PMCID: PMC2928939.
4. Cancer of the Ovary - Cancer Stat Facts [Internet]. SEER. 2022 Accessed 27 April 2022. Available from: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/ovary.html>.
5. American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2022*. Atlanta, Ga: American Cancer Society; 2022.
6. Gaona-Luviano P, Medina-Gaona LA, Magaña-Pérez K. Epidemiology of ovarian cancer. *Chin Clin Oncol.* 2020 Aug;9(4):47. doi: 10.21037/cco-20-34. Epub 2020 Jun 30. PMID: 32648448.
7. Arora T, Mullangi S, Lekkala MR. Ovarian Cancer. [Updated 2023 Jan 2]. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK567760/>
8. Zheng G, Yu H, Kanerva A, Försti A, Sundquist K, Hemminki K. Familial risks of ovarian cancer by age at diagnosis, proband type and histology. *PLoS One.* 2018 Oct 3;13(10):e0205000. doi: 10.1371/journal.pone.0205000. Erratum in: *PLoS One.* 2018 Oct 26;13(10):e0206721. PMID: 30281663; PMCID: PMC6169923.
9. Carter JS, Downs LS Jr. Ovarian Cancer Tests and Treatment. *Female Patient (Parsippany).* 2011;36(4):30-35. PMID: 21841893; PMCID: PMC3154728.
10. Doubeni CA, Doubeni AR, Myers AE. Diagnosis and Management of Ovarian Cancer. *Am Fam Physician.* 2016 Jun 1;93(11):937-44. PMID: 27281838.

11. Lheureux S., Gourley C, Vergote I, Oza AM. Epithelial ovarian cancer. *Lancet*. 2019 Mar 23;393(10177):1240-1253. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32552-2. PMID: 30910306.
12. Wen J., ZhaoZ., HuangL., LiL., LiJ., ZengY., WuJ., MiaoY. Switch of the ovarian cancer cell to a calcifying phenotype in the calcification of ovarian cancer. *J Cancer*. 2018 Feb 28; 9(6):1006-1016.
13. Das D.K. Psammoma body: a product of dystrophic calcification or of a biologically active process that aims at limiting the growth and spread of tumor? *Diagn Cytopathol*. 2009 Jul; 37(7):534-41.
14. Rosen DG, Zhang Z, Shan W, Liu J. Morphological and molecular basis of ovarian serous carcinoma. *J Biomed Res*. 2010 Jul; 24(4):257-63. doi: 10.1016/S1674-8301(10)60036-X.
15. Okada S., Ohaki Y., Inoue K., Kawamura T., Hayashi T., Kato T., Kumazaki T. Calcifications in mucinous and serous cystic ovarian tumors. *J Nippon Med Sch*. 2005 Feb; 72(1):29-33.
16. Matulonis UA, Sood AK, Fallowfield L, Howitt BE, Sehouli J, Karlan BY. Ovarian cancer. *Nat Rev Dis Primers*. 2016 Aug 25;2:16061. doi: 10.1038/nrdp.2016.61. PMID: 27558151; PMCID: PMC7290868.,
17. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J. Clin*. 2021, 71, 209–249.
18. McLemore MR, Miaskowski C, Aouizerat BE, Chen LM, Dodd MJ. Epidemiological and genetic factors associated with ovarian cancer. *Cancer Nurs*. 2009 Jul-Aug; 32(4):281(8):289-90. doi: 10.1097/NCC.0b013e31819d30d6.
19. Lengyel E. Ovarian cancer development and metastasis. *Am J Pathol*. 2010 Sep; 177(3):1053-64.
20. Henderson JT, Webber EM, Sawaya GF. Screening for Ovarian Cancer: An Updated Evidence Review for the U.S. Preventive Services Task Force

[Internet]. Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US); 2018 Feb. (Evidence Synthesis, No. 157.) Chapter 1, Introduction. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493401/>

21. Reid BM, Permuth JB, Sellers TA. Epidemiology of ovarian cancer: a review. *Cancer Biol Med.* 2017 Feb; 14(1):9-32. doi: 10.20892/j.issn.2095-3941.2016.0084.
22. Fedorenko ZP, Mykhailovych YuI, Hulak LO. [Cancer in Ukraine, 2018-2019]. *Bulletin of national cancer registry of Ukraine.* 2020; 21:60-61. Ukrainian.
23. La Vecchia C. Ovarian cancer: epidemiology and risk factors. *Eur J Cancer Prev.* 2017 Jan; 26(1):55-62. doi: 10.1097/CEJ.0000000000000217., Beehler GP, Sekhon M, Baker JA, Teter BE, McCann SE, Rodabaugh KJ, Moysich KB. Risk of ovarian cancer associated with BMI varies by menopausal status. *J Nutr.* 2006 Nov;136(11):2881-6. doi: 10.1093/jn/136.11.2881. PMID: 17056817
24. Zamwar UM, Anjankar AP. Aetiology, Epidemiology, Histopathology, Classification, Detailed Evaluation, and Treatment of Ovarian Cancer. *Cureus.* 2022 Oct 21;14(10):e30561. doi: 10.7759/cureus.30561. PMID: 36415372; PMCID: PMC9676071.
25. King MC, Marks JH, Mandell JB. and New York Breast Cancer Study. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science.* 2003;302(5645):643–646
26. Pal T, Permuth-Wey J, Betts JA, Krischer JP, Fiorica J, Arango H, LaPolla J, Hoffman M, Martino MA, Wakeley K, Wilbanks G, Nicosia S, Cantor A, Sutphen R. BRCA1 BRCA2 mutations account for a large proportion of ovarian carcinoma cases. *Cancer.* 2005;104(12):2807–2816
27. Guo T, Dong X, Xie S, Zhang L, Zeng P, Zhang L. Cellular Mechanism of Gene Mutations and Potential Therapeutic Targets in Ovarian Cancer. *Cancer Manag Res.* 2021 Apr 8;13:3081-3100. doi: 10.2147/CMAR.S292992. PMID: 33854378; PMCID: PMC8041604.



28. Petrucelli N, Daly MB, Pal T. BRCA1- and BRCA2-Associated Hereditary Breast and Ovarian Cancer. 1998 Sep 4 [Updated 2022 May 26]. In: Adam MP, Mirzaa GM, Pagon RA, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2023. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1247/>
29. Chirasophon, S., Manchana, T., & Teerapakpinyo, C. (2017). High-risk epithelial ovarian cancer patients for hereditary ovarian cancer. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 43(5), 929-934. <https://doi.org/10.1111/jog.13287>
30. Okunowo AA, Adaramoye VO. Women's Knowledge on Ovarian Cancer Symptoms and Risk Factors in Nigeria: An Institutional-based Study. *J Epidemiol Glob Health*. 2018 Dec;8(1-2):34-41. doi: 10.2991/j.jegh.2018.07.002. PMID: 30859785; PMCID: PMC7325817.
31. Kvåle G, Heuch I, Nilssen S, Beral V. Reproductive factors and risk of ovarian cancer: a prospective study. *Int J Cancer*. 1988 Aug 15;42(2):246-51. doi: 10.1002/ijc.2910420217. PMID: 3403067
32. Adami HO, Hsieh CC, Lambe M, Trichopoulos D, Leon D, Persson I, Ekblom A, Janson PO. Parity, age at first childbirth, and risk of ovarian cancer. *Lancet*. 1994 Nov 5;344(8932):1250-4. doi: 10.1016/s0140-6736(94)90749-8. PMID: 7967985.
33. Navneetha Sharath Hardikar. The Importance of Early Detection of Ovarian Cancer: Epidemiology and Risk Factors. *Basic & Clinical Cancer Research*. 2021. Vol 13, №3: 201-209. <https://doi.org/10.18502/bccr.v13i3.11405>
34. Yang CY, Kuo HW, Chiu HF. Age at first birth, parity, and risk of death from ovarian cancer in Taiwan: a country of low incidence of ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2007 Jan-Feb;17(1):32-6. doi: 10.1111/j.1525-1438.2007.00804.x. PMID: 17291228.
35. Le DC, Kubo T, Fujino Y, Sokal DC, Vach TH, Pham TM, Matsuda S. Reproductive factors in relation to ovarian cancer: a case-control study in

- Northern Vietnam. *Contraception*. 2012 Nov;86(5):494-9. doi: 10.1016/j.contraception.2012.02.019. Epub 2012 May 11. PMID: 22579106.,
36. Moorman PG, Schildkraut JM, Calingaert B, Halabi S, Vine MF, Berchuck A. Ovulation and ovarian cancer: a comparison of two methods for calculating lifetime ovulatory cycles (United States). *Cancer Causes Control*. 2002 Nov;13(9):807-11. doi: 10.1023/a:1020678100977. PMID: 12462545.
37. Mori M, Harabuchi I, Miyake H, Casagrande JT, Henderson BE, Ross RK. Reproductive, genetic, and dietary risk factors for ovarian cancer. *Am J Epidemiol*. 1988 Oct;128(4):771-7. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a115030. PMID: 3421242.
38. Moorman PG, Calingaert B, Palmieri RT, Iversen ES, Bentley RC, Halabi S, Berchuck A, Schildkraut JM. Hormonal risk factors for ovarian cancer in premenopausal and postmenopausal women. *Am J Epidemiol*. 2008 May 1;167(9):1059-69. doi: 10.1093/aje/kwn006. Epub 2008 Feb 25. PMID: 18303003; PMCID: PMC2663520.
39. Whelan E, Kalliala I, Semertzidou A, Raglan O, Bowden S, Kechagias K, Markozannes G, Cividini S, McNeish I, Marchesi J, MacIntyre D, Bennett P, Tsilidis K, Kyrgiou M. Risk Factors for Ovarian Cancer: An Umbrella Review of the Literature. *Cancers (Basel)*. 2022 May 30;14(11):2708. doi: 10.3390/cancers14112708. PMID: 35681688; PMCID: PMC9179274.
40. Arthur RS, Kirsh VA, Rohan TE. Dietary B-Vitamin Intake and Risk of Breast, Endometrial, Ovarian and Colorectal Cancer among Canadians. *Nutr Cancer*. 2019; 71 (7): 1067-1077. doi: 10.1080/01635581.2019.1597904. Epub 2019 Apr 7. PMID: 30955365.
41. Larsson SC, Holmberg L, Wolk A. Fruit and vegetable consumption in relation to ovarian cancer incidence: the Swedish Mammography Cohort. *Br J Cancer*. 2004 Jun 1;90(11):2167-70. doi: 10.1038/sj.bjc.6601872. PMID: 15150575; PMCID: PMC2409490.

42. Larsson SC, Bergkvist L, Wolk A. Milk and lactose intakes and ovarian cancer risk in the Swedish Mammography Cohort. *Am J Clin Nutr.* 2004 Nov;80(5):1353-7. doi: 10.1093/ajcn/80.5.1353. PMID: 15531686.
43. Blank MM, Wentzensen N, Murphy MA, Hollenbeck A, Park Y. Dietary fat intake and risk of ovarian cancer in the NIH-AARP Diet and Health Study. *Br J Cancer.* 2012 Jan 31;106(3):596-602. doi: 10.1038/bjc.2011.572. Epub 2012 Jan 5. PMID: 22223086; PMCID: PMC3273348.
44. Pan SY, Ugnat AM, Mao Y. Physical activity and the risk of ovarian cancer: a case-control study in Canada. *Int J Cancer.* 2005 Nov 1;117(2):300-7. doi: 10.1002/ijc.21157. PMID: 15898119. Cottreau CM, Ness RB, Kriska AM. Physical activity and reduced risk of ovarian cancer. *Obstet Gynecol.* 2000 Oct;96(4):609-14. doi: 10.1016/s0029-7844(00)00972-8. PMID: 11004368.
45. Delort L, Kwiatkowski F, Chalabi N, Satih S, Bignon YJ, Bernard-Gallon DJ. Central adiposity as a major risk factor of ovarian cancer. *Anticancer Res.* 2009 Dec;29(12):5229-34. PMID: 20044641.
46. World Health. O.; International Agency for Research on. C. Female genital tumours. 5th edition ed.; International Agency for 228 Research on Cancer: Lyon. France. 2020.
47. Köbel M. Kang EY. The Evolution of Ovarian Carcinoma Subclassification. *Cancers (Basel).* 2022 Jan 14;14(2):416. doi: 10.3390/cancers14020416. PMID: 35053578; PMCID: PMC8774015.
48. Peres, L.C.; Cushing-Haugen, K.L.; Kobel, M.; Harris, H.R.; Berchuck, A.; Rossing, M.A.; Schildkraut, J.M.; Doherty, J.A. Invasive Epithelial Ovarian Cancer Survival by Histotype and Disease Stage. *J. Natl. Cancer Inst.* 2019, 111, 60–68.
49. Koshiyama M, Matsumura N, Konishi I. Subtypes of Ovarian Cancer and Ovarian Cancer Screening. *Diagnostics (Basel).* 2017 Mar 2; 7(1):12. doi: 10.3390/diagnostics7010012.
50. Yakovtsova II, Oliynyk AYe, Danyliuk SV, Hryhorenko VR. [Modern concepts of ovarian cancer]. *Visnyk Vinnytskoho natsionalnoho medychnoho*

- universytetu. 2019; 23(1):178-183. Ukrainian. doi: 10.31393/reports-vnmedical-2019-23(1)-32.
51. Peres LC, Cushing-Haugen KL, Anglesio M, Wicklund K, Bentley R, Berchuck A, Kelemen LE, Nazeran TM, Gilks CB, Harris HR, Huntsman DG, Schildkraut JM, Rossing MA, Köbel M, Doherty JA. Histotype classification of ovarian carcinoma: A comparison of approaches. *Gynecol Oncol*. 2018 Oct;151(1):53-60. doi: 10.1016/j.ygyno.2018.08.016. Epub 2018 Aug 16. PMID: 30121132; PMCID: PMC6292681.
52. Hatano Y, Hatano K, Tamada M, Morishige KI, Tomita H, Yanai H, Hara A. A Comprehensive Review of Ovarian Serous Carcinoma. *Adv Anat Pathol*. 2019 Sep;26(5):329-339. doi: 10.1097/PAP.000000000000243. PMID: 31368906; PMCID: PMC7043727.
53. Vang R, Shih IeM, Kurman RJ. Ovarian low-grade and high-grade serous carcinoma: pathogenesis, clinicopathologic and molecular biologic features, and diagnostic problems. *Adv Anat Pathol*. 2009 Sep;16(5):267-82. doi: 10.1097/PAP.0b013e3181b4fffa. PMID: 19700937; PMCID: PMC2745605
54. Kim J, Park EY, Kim O, Schilder JM, Coffey DM, Cho CH, Bast RC Jr. Cell Origins of High-Grade Serous Ovarian Cancer. *Cancers (Basel)*. 2018 Nov 12;10(11):433. doi: 10.3390/cancers10110433. PMID: 30424539; PMCID: PMC6267333.
55. Babaier A, Mal H, Alselwi W, Ghatage P. Low-Grade Serous Carcinoma of the Ovary: The Current Status. *Diagnostics (Basel)*. 2022 Feb 10;12(2):458. doi: 10.3390/diagnostics12020458. PMID: 35204549; PMCID: PMC8871133.
56. Dochiț C, Stepan AE, Mărgăritescu C, Ciurea R, Simionescu CE. Low Grade Ovarian Serous Carcinoma - A Clinical-Morphologic Study. *Curr Health Sci J*. 2019 Jan-Mar;45(1):42-46. doi: 10.12865/CHSJ.45.01.05. Epub 2019 Mar 31. PMID: 31297261; PMCID: PMC6592674.
57. Amante S, Santos F, Cunha TM. Low-grade serous epithelial ovarian cancer: a comprehensive review and update for radiologists. *Insights Imaging*. 2021 May

- 11;12(1):60. doi: 10.1186/s13244-021-01004-7. PMID: 33974157; PMCID: PMC8113429.
58. Otsuka I. Mechanisms of High-Grade Serous Carcinogenesis in the Fallopian Tube and Ovary: Current Hypotheses, Etiologic Factors, and Molecular Alterations. *Int J Mol Sci.* 2021 Apr 23;22(9):4409. doi: 10.3390/ijms22094409. PMID: 33922503; PMCID: PMC8122889.
59. Bunde S, Baskota SU, Fine J, Khader S. Educational Case: High-Grade Serous Carcinoma of the Ovary. *Acad Pathol.* 2021 Aug 27;8:23742895211032339. doi: 10.1177/23742895211032339. PMID: 34471668; PMCID: PMC8404665.
60. Lisio MA, Fu L, Goyeneche A, Gao ZH, Telleria C. High-Grade Serous Ovarian Cancer: Basic Sciences, Clinical and Therapeutic Standpoints. *Int J Mol Sci.* 2019 Feb 22; 20(4):952. doi: 10.3390/ijms20040952.
61. Mei J, Tian H, Huang HS, Hsu CF, Liou Y, Wu N, Zhang W, Chu TY. Cellular models of development of ovarian high-grade serous carcinoma: A review of cell of origin and mechanisms of carcinogenesis. *Cell Prolif.* 2021 May;54(5):e13029. doi: 10.1111/cpr.13029. Epub 2021 Mar 25. PMID: 33768671; PMCID: PMC8088460.
62. Dilley J, Burnell M, Gentry-Maharaj A, Ryan A, Neophytou C, Apostolidou S, Karpinskyj C, Kalsi J, Mould T, Woolas R, Singh N, Widschwendter M, Fallowfield L, Campbell S, Skates SJ, McGuire A, Parmar M, Jacobs I, Menon U. Ovarian cancer symptoms, routes to diagnosis and survival - Population cohort study in the 'no screen' arm of the UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening (UKCTOCS). *Gynecol Oncol.* 2020 Aug;158(2):316-322. doi: 10.1016/j.ygyno.2020.05.002. Epub 2020 Jun 17. PMID: 32561125; PMCID: PMC7453382.
63. Goff B. Symptoms associated with ovarian cancer. *Clin Obstet Gynecol.* 2012 Mar;55(1):36-42. doi: 10.1097/GRF.0b013e3182480523. PMID: 22343227., Hamilton W, Peters TJ, Bankhead C, Sharp D. Risk of ovarian cancer in women with symptoms in primary care: population based case-control study.

- BMJ. 2009 Aug 25;339:b2998. doi: 10.1136/bmj.b2998. PMID: 19706933; PMCID: PMC2731836.
64. Funston G, Van Melle M, Baun ML, Jensen H, Helsper C, Emery J, Crosbie EJ, Thompson M, Hamilton W, Walter FM. Variation in the initial assessment and investigation for ovarian cancer in symptomatic women: a systematic review of international guidelines. *BMC Cancer*. 2019 Nov 1;19(1):1028. doi: 10.1186/s12885-019-6211-2. PMID: 31676000; PMCID: PMC6823968.
65. Doroudi M, Kramer BS, Pinsky PF. The bimanual ovarian palpation examination in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian cancer screening trial: Performance and complications. *J Med Screen*. 2017 Dec;24(4):220-222. doi: 10.1177/0969141316680381. Epub 2016 Nov 30. PMID: 27903809.
66. Kobayashi, H., Ooi, H., Yamada, Y., Sakata, M., Kawaguchi, R., Kanayama, S., Sumimoto, K. and Terao, T. (2007), Serum CA125 level before the development of ovarian cancer. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 99: 95-99. <https://doi.org/10.1016/j.ijgo.2007.06.003>
67. Charkhchi P, Cybulski C, Gronwald J, Wong FO, Narod SA, Akbari MR. CA125 and Ovarian Cancer: A Comprehensive Review. *Cancers (Basel)*. 2020 Dec 11;12(12):3730. doi: 10.3390/cancers12123730. PMID: 33322519; PMCID: PMC7763876.
68. Gandhi T, Zubair M, Bhatt H. Cancer Antigen 125. [Updated 2023 Jan 18]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562245/>
69. Luo, H-J, Hu, Z-D, Cui, M, Zhang, X-F, Tian, W-Y, Ma, C-Q, et al. Diagnostic performance of CA125, HE4, ROMA, and CPH-I in identifying primary ovarian cancer. *J Obstet Gynaecol Res*. 2023; 49( 3): 998– 1006. <https://doi.org/10.1111/jog.15540>, Kamal, R., Hamed, S., Mansour, S., Mounir, Y., & Sallam, S. A. (2018). Ovarian cancer screening—Ultrasound; impact on ovarian cancer mortality. *The British Journal of Radiology*, 91(1090). <https://doi.org/10.1259/bjr.20170571>

70. Rosati, A., Alletti, S. G., Capozzi, V. A., Mirandola, M., Vargiu, V., Fedele, C., Uccella, S., & Vascone, C. (2020). Role of ultrasound in the detection of recurrent ovarian cancer: A review of the literature. *Gland Surgery*, 9(4), 1092-1101. <https://doi.org/10.21037/gs-20-357>, Bäuml M, Gallant D, Druckmann R, Kuhn W. Ultrasound screening of ovarian cancer. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2019 Sep 17;41(3). doi: 10.1515/hmbci-2019-0022. PMID: 31661436.
71. Landolfo C, Valentin L, Franchi D, Van Holsbeke C, Fruscio R, Froyman W, Sladkevicius P, Kaijser J, Ameye L, Bourne T, Savelli L, Coosemans A, Testa A, Timmerman D. Differences in ultrasound features of papillations in unilocular-solid adnexal cysts: a retrospective international multicenter study. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2018 Aug;52(2):269-278. doi: 10.1002/uog.18951. PMID: 29119698
72. Mathieu KB, Bedi DG, Thrower SL, Qayyum A, Bast RC Jr. Screening for ovarian cancer: imaging challenges and opportunities for improvement. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2018 Mar;51(3):293-303. doi: 10.1002/uog.17557. PMID: 28639753; PMCID: PMC5788737.
73. Lawson-Michod KA, Watt MH, Grieshober L, Green SE, Karabegovic L, Derzon S, Owens M, McCarty RD, Doherty JA, Barnard ME. Pathways to ovarian cancer diagnosis: a qualitative study. *BMC Womens Health*. 2022 Nov 4;22(1):430. doi: 10.1186/s12905-022-02016-1. PMID: 36333689; PMCID: PMC9636716.
74. Liberto JM, Chen SY, Shih IM, Wang TH, Wang TL, Pisanic TR 2nd. Current and Emerging Methods for Ovarian Cancer Screening and Diagnostics: A Comprehensive Review. *Cancers (Basel)*. 2022 Jun 11;14(12):2885. doi: 10.3390/cancers14122885. PMID: 35740550; PMCID: PMC9221480.
75. Ganeshan D., Bhosale P., Wei W., et al. Increase in post-therapy tumor calcification on CT scan is not an indicator of response to therapy in low-grade serous ovarian cancer. *Abdom Radiol (NY)*. 2016; 41(8):1589-1595.

76. Silva E.G., Deavers M.T., Parlow A.F., Gershenson D.M., Malpica A. Calcifications in ovary and endometrium and their neoplasms. *Mod Pathol.* 2003 Mar; 16(3):219-22., Moskalenko R., Romaniuk A. Pathological biomineralization of soft tissues: monograph. Sumy, Sumy State University, 2020. – 127 p.
77. Moskalenko R.A. Biomineralizatsiia u tkanynakh liudskoho orhanizmu. Aktualni problemy suchasnoi medytsyny: Visnyk ukrainskoi medychnoi stomatolohichnoi akademii. 2017; 17 (1(57)):308-313. [in Ukrainian].
78. Fanl M., Changqiu W., Yan L. et al. Psammoma bodies in two types of human ovarian tumours: a mineralogical study. *Miner Petrol.* 2015; 109:357–365.
79. Ganeshan D., Bhosale P., Wei W., et al. Increase in post-therapy tumor calcification on CT scan is not an indicator of response to therapy in low-grade serous ovarian cancer. *Abdom Radiol (NY).* 2016; 41(8):1589-1595.,
80. Burkill, G.J.C.; Allen, S.D.; A'Hern, R.P.; Gore, M.E.; King, D.M. Significance of tumour calcification in ovarian carcinoma. *Br. J. Radiol.* 2009, 82, 640–644.
81. Ferenczy A, Talens M, Zoghby M, Hussain SS. Ultrastructural studies on the morphogenesis of psammoma bodies in ovarian serous neoplasia. *Cancer.* 1977 Jun; 39(6):2451-9. doi: 10.1002/1097-0142(197706)39:6<2451::aid-cncr2820390623>3.0.co;2-7. PMID: 872045.
82. Tsolaki E, Bertazzo S. Pathological Mineralization: The Potential of Mineralomics. *Materials (Basel).* 2019 Sep 25;12(19):3126. doi: 10.3390/ma12193126. PMID: 31557841; PMCID: PMC6804219.
83. Wen J., Miao Y., Wang S., Tong R., Zhao Z., Wu J. Calcification: A Disregarded or Ignored Issue in the Gynecologic Tumor Microenvironments. *IntJ Gynecol Cancer.* 2018 Mar; 28(3):486-492.
84. Hudelist G., Singer C.F., Kubista E, Manavi M, Mueller R, Pischinger K, Czerwenka K. Presence of nanobacteria in psammoma bodies of ovarian cancer: evidence for pathogenetic role in intratumoral biomineralization. *Histopathology.* 2004 Dec; 45(6):633-7.



85. Breitschwerdt E.B., Sontakke S., Cannedy A., Hancock S.I., Bradley J.M. Infection with *Bartonella weissii* and detection of *Nanobacterium* antigens in a North Carolina beef herd. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39:879–882.
86. Lee SJ, Lee IK, Jeon JH. Vascular Calcification-New Insights Into Its Mechanism. *Int J Mol Sci.* 2020 Apr 13;21(8):2685. doi: 10.3390/ijms21082685. PMID: 32294899; PMCID: PMC7216228.
87. Olivera Merlin P.S., Leyva Bohorquez Pdel C., Martínez-Cruz R., Pina Canseco S., Hernandez P., Martínez-Cruz M., Sánchez Rubio M, Martínez L., Pérez-Campos E. A study on inorganic elements in psammomas from ovarian & thyroid cancer. *Indian J Med Res.* 2012; 135(2):217-20.
88. Yaman M, Kaya G, Simsek M. Comparison of trace element concentrations in cancerous and noncancerous human endometrial and ovary tissues. *Int J Gynecol Cancer.* 2007 Jan-Feb;17(1):220-8. doi: 10.1111/j.1525-1438.2006.00742.x. PMID: 17291257.
89. Bailey, K. A., Klymenko, Y., Feist, P. E., Hummon, A. B., Stack, M. S., & Schultz, Z. D. (2017). Chemical Analysis of Morphological Changes in Lysophosphatidic Acid-Treated Ovarian Cancer Cells. *Scientific Reports*, 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15547-7>
90. Zhang, R., Zhao, G., Shi, H., Zhao, X., Wang, B., Dong, P., Watari, H., Pfeffer, L. M., & Yue, J. (2020). Zinc regulates primary ovarian tumor growth and metastasis through the epithelial to mesenchymal transition. *Free radical biology & medicine*, 160, 775. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.09.010>
91. Padmanabhan A, Kaushik M, Niranjana R, Richards JS, Ebright B, Venkatasubbu GD. Zinc Oxide nanoparticles induce oxidative and proteotoxic stress in ovarian cancer cells and trigger apoptosis Independent of p53-mutation status. *Appl Surf Sci.* 2019 Sep;487:807-818. doi: 10.1016/j.apsusc.2019.05.099. PMID: 32042215; PMCID: PMC7009796.
92. Zhao, S., Zhang, X., Gao, F., Chi, H., Zhang, J., Xia, Z., Cheng, C., & Liu, J. (2023). Identification of copper metabolism-related subtypes and establishment

- of the prognostic model in ovarian cancer. *Frontiers in Endocrinology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.114579>
93. Lin S, Yang H. Ovarian cancer risk according to circulating zinc and copper concentrations: A meta-analysis and Mendelian randomization study. *Clin Nutr*. 2021 Apr;40(4):2464-2468. doi: 10.1016/j.clnu.2020.10.011. Epub 2020 Oct 14. PMID: 33129595
94. Michalczyk K., & Cymbaluk-Płoska A. (2020). The Role of Zinc and Copper in Gynecological Malignancies. *Nutrients*, 12(12). <https://doi.org/10.3390/nu12123732>
95. Basuli, D., Tesfay, L., Deng, Z., Paul, B., Yamamoto, Y., Ning, G., Xian, W., McKeon, F., Lynch, M., Crum, C. P., Hegde, P., Brewer, M., Wang, X., Miller, L. D., Dymant, N., Torti, F. M., & Torti, S. V. (2017). Iron addiction: A novel therapeutic target in ovarian cancer. *Oncogene*, 36(29), 4089. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.11>
96. Zhang H, Li J, Hu Y, Shen M, Shi X, Zhang G. Folic acid-targeted iron oxide nanoparticles as contrast agents for magnetic resonance imaging of human ovarian cancer. *J Ovarian Res*. 2016 Mar 29;9:19. doi: 10.1186/s13048-016-0230-2. PMID: 27025582; PMCID: PMC4812633.
97. Torti SV, Torti FM. Iron and Cancer: 2020 Vision. *Cancer Res*. 2020 Dec 15;80(24):5435-5448. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-20-2017. Epub 2020 Sep 14. PMID: 32928919; PMCID: PMC8118237.
98. Liu, W., Qdaisat, A., Soliman, P. T., Ramondetta, L., Lopez, G., Narayanan, S., Zhou, S., Cohen, L., Bruera, E., & Yeung, C. J. (2019). Hypomagnesemia and Survival in Patients with Ovarian Cancer Who Received Chemotherapy with Carboplatin. *The Oncologist*, 24(6), e312. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2018-0465>
99. Leidi M, Wolf F, Maier JAM. Magnesium and cancer: more questions than answers. In: Vink R, Nechifor M, editors. *Magnesium in the Central Nervous System* [Internet]. Adelaide (AU): University of Adelaide Press; 2011. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507261/>

100. Zhao J, Giri A, Zhu X, Shrubsole MJ, Jiang Y, Guo X, Ness R, Seidner DL, Giovannucci E, Edwards TL, Dai Q. Calcium: magnesium intake ratio and colorectal carcinogenesis, results from the prostate, lung, colorectal, and ovarian cancer screening trial. *Br J Cancer*. 2019 Oct;121(9):796-804. doi: 10.1038/s41416-019-0579-2. Epub 2019 Sep 23. PMID: 31543516; PMCID: PMC6889387.
101. Yang P, Troncone L, Augur ZM, Kim SSJ, McNeil ME, Yu PB. The role of bone morphogenetic protein signaling in vascular calcification. *Bone*. 2020 Dec;141:115542. doi: 10.1016/j.bone.2020.115542. Epub 2020 Jul 28. PMID: 32736145; PMCID: PMC8185454.
102. Ma Y, Ma L, Guo Q, Zhang S. Expression of bone morphogenetic protein-2 and its receptors in epithelial ovarian cancer and their influence on the prognosis of ovarian cancer patients. *J Exp Clin Cancer Res*. 2010 Jun 30; 29(1):85. doi: 10.1186/1756-9966-29-85. PMID: 20587070; PMCID: PMC2907340.
103. Le Page C, Puiffe ML, Meunier L, Zietarska M, de Ladurantaye M, Tonin PN, Provencher D, Mes-Masson AM. BMP-2 signaling in ovarian cancer and its association with poor prognosis. *J Ovarian Res*. 2009 Apr 14;2:4. doi: 10.1186/1757-2215-2-4. PMID: 19366455; PMCID: PMC2674440.
104. Zhao H., Chen Q., Alam A., Cui J., Suen K.C., Soo A.P., Eguchi S., Gu J., Ma D. The role of osteopontin in the progression of solid organ tumour. *Cell Death Dis*. 2018 Mar 2; 9(3):356
105. Maki M, Hirota S, Kaneko Y, Morohoshi T. Expression of osteopontin messenger RNA by macrophages in ovarian serous papillary cystadenocarcinoma: a possible association with calcification of psammoma bodies. *Pathol Int*. 2000 Jul;50(7):531-5. doi: 10.1046/j.1440-1827.2000.01075.x. PMID: 10886734.
106. Wang Z.Q., Keita M., Bachvarova M., Gobeil S., Morin C., Plante M., Gregoire J, Renaud M.C., Sebastianelli A., Trinh X.B., Bachvarov D.

- Inhibition of RUNX2 transcriptional activity blocks the proliferation, migration and invasion of epithelial ovarian carcinoma cells. *PLoS One*. 2013 Oct 4; 8(10):e74384.
107. Chen D, Li B, Lei T, Na D, Nie M, Yang Y, Congjia, Xie, He Z, Wang J. Selective mediation of ovarian cancer SKOV3 cells death by pristine carbon quantum dots/Cu<sub>2</sub>O composite through targeting matrix metalloproteinases, angiogenic cytokines and cytoskeleton. *J Nanobiotechnology*. 2021 Mar 4;19(1):68. doi: 10.1186/s12951-021-00813-8. PMID: 33663548; PMCID: PMC7934478.
  108. Gilks C.B., Bell D.A., Scully R.E. Serous psammocarcinoma of the ovary and peritoneum. *Int J Gynecol Pathol* 1990;9: 110–21.
  109. Condello S., Morgan C.A., Nagdas S., Cao L., Turek J., Hurley T.D., Matei D.  $\beta$ -Catenin-regulated ALDH1A1 is a target in ovarian cancer spheroids. *Oncogene*. 2015 Apr 30; 34(18):2297-308.
  110. Golub EE. Biomineralization and matrix vesicles in biology and pathology. *Semin Immunopathol*. 2011 Sep;33(5):409-17. doi: 10.1007/s00281-010-0230-z. Epub 2010 Dec 8. PMID: 21140263; PMCID: PMC3139768.
  111. Murshed M, McKee MD. Molecular determinants of extracellular matrix mineralization in bone and blood vessels. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2010 Jul;19(4):359-65. doi: 10.1097/MNH.0b013e3283393a2b. PMID: 20489614.
  112. Hasegawa T, Hongo H, Yamamoto T, Abe M, Yoshino H, Haraguchi-Kitakamae M, Ishizu H, Shimizu T, Iwasaki N, Amizuka N. Matrix Vesicle-Mediated Mineralization and Osteocytic Regulation of Bone Mineralization. *Int J Mol Sci*. 2022 Sep 1;23(17):9941. doi: 10.3390/ijms23179941. PMID: 36077336; PMCID: PMC9456179.
  113. Anderson HC. Matrix vesicles and calcification. *Curr Rheumatol Rep*. 2003 Jun;5(3):222-6. doi: 10.1007/s11926-003-0071-z. PMID: 12744815.
  114. Lowe D, Sanvictores T, Zubair M, et al. Alkaline Phosphatase. [Updated 2022 Nov 4]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls

Publishing; 2023 Jan-. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459201/>

115. Sharma, U., Pal, D., & Prasad, R. (2014). Alkaline Phosphatase: An Overview. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 29(3), 269-278. <https://doi.org/10.1007/s12291-013-0408-y>
116. Elhamady, H. Y. (2020). Calcified peritoneal metastasis due to advanced ovarian cancer: Incidental finding in bone scan and single-photon emission computed tomography-computed tomography. *World Journal of Nuclear Medicine*, 19(2), 174-176. [https://doi.org/10.4103/wjnm.WJNM\\_99\\_18](https://doi.org/10.4103/wjnm.WJNM_99_18)
117. Burkill GJ, Allen SD, A'hern RP, Gore ME, King DM. Significance of tumour calcification in ovarian carcinoma. *Br J Radiol*. 2009 Aug;82(980):640-4. doi: 10.1259/bjr/12716831. Epub 2009 Mar 30. PMID: 19332521.
118. Jena, S. K., Mishra, P., Mohapatra, V., & Singh, S. (2015). Bilateral Serous Psammocarcinoma of Ovary: Rare Variant Low Grade Serous Carcinoma. *Case Reports in Obstetrics and Gynecology*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/531242>
119. Rieznik AV, Hapchenko AV, Hapchenko VV, Starkiv MP, Moskalenko RA. Ultrazvukove ekho biomineralizatsii shchytobodibnoi zalozy. *J. Clin. Exp. Med. Res*. 2015;3(2):188-98.
120. Mitra AK. Ovarian Cancer Metastasis: A Unique Mechanism of Dissemination. *Tumor Metastasis [Internet]*. 2016 Sep 14; Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/64700>
121. Tjhay F, Motohara T, Tayama S, Narantuya D, Fujimoto K, Guo J, Sakaguchi I, Honda R, Tashiro H, Katabuchi H. CD44 variant 6 is correlated with peritoneal dissemination and poor prognosis in patients with advanced epithelial ovarian cancer. *Cancer Sci*. 2015 Oct;106(10):1421-8. doi: 10.1111/cas.12765. Epub 2015 Sep 21. PMID: 26250934; PMCID: PMC4638001.
122. Nakayama, K., Nakayama, N., Katagiri, H., & Miyazaki, K. (2012). *Mechanisms of Ovarian Cancer Metastasis: Biochemical Pathways*.

International Journal of Molecular Sciences, 13(9), 11705-11717.  
<https://doi.org/10.3390/ijms130911705>

123. Yousefi M, Dehghani S, Nosrati R, Ghanei M, Salmaninejad A, Rajaie S, Hasanzadeh M, Pasdar A. Current insights into the metastasis of epithelial ovarian cancer - hopes and hurdles. *Cell Oncol (Dordr)*. 2020 Aug;43(4):515-538. doi: 10.1007/s13402-020-00513-9. Epub 2020 May 16. PMID: 32418122.
124. Cai J, Tang H, Xu L, Wang X, Yang C, Ruan S, Guo J, Hu S, Wang Z. Fibroblasts in omentum activated by tumor cells promote ovarian cancer growth, adhesion and invasiveness. *Carcinogenesis*. 2012 Jan;33(1):20-9. doi: 10.1093/carcin/bgr230. Epub 2011 Oct 21. PMID: 22021907.
125. Coffman, L. G., Burgos-Ojeda, D., Wu, R., Cho, K., Bai, S., & Buckanovich, R. J. (2016). New models of hematogenous ovarian cancer metastasis demonstrate preferential spread to the ovary and a requirement for the ovary for abdominal dissemination. *Translational research : The journal of laboratory and clinical medicine*, 175, 92.  
<https://doi.org/10.1016/j.trsl.2016.03.016>
126. Martin TA, Ye L, Sanders AJ, et al. Cancer Invasion and Metastasis: Molecular and Cellular Perspective. In: Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-2013. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK164700/>
127. Cai J, Tang H, Xu L, Wang X, Yang C, Ruan S, Guo J, Hu S, Wang Z. Fibroblasts in omentum activated by tumor cells promote ovarian cancer growth, adhesion and invasiveness. *Carcinogenesis*. 2012 Jan;33(1):20-9. doi: 10.1093/carcin/bgr230. Epub 2011 Oct 21. PMID: 22021907.
128. Zhang Y, Tang H, Cai J, Zhang T, Guo J, Feng D, Wang Z. Ovarian cancer-associated fibroblasts contribute to epithelial ovarian carcinoma metastasis by promoting angiogenesis, lymphangiogenesis and tumor cell invasion. *Cancer Lett*. 2011 Apr 1;303(1):47-55. doi: 10.1016/j.canlet.2011.01.011. PMID: 21310528.

129. Rosso, M., Majem, B., Devis, L., Lapyckyj, L., Besso, M. J., Llauradó, M., Abascal, M. F., Matos, M. L., Lanau, L., Castellví, J., Sánchez, J. L., Benavente, A. P., Gil-Moreno, A., Reventós, J., Margalef, A. S., Rigau, M., & Vazquez-Levin, M. H. (2017). E-cadherin: A determinant molecule associated with ovarian cancer progression, dissemination and aggressiveness. *PLoS ONE*, 12(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184439>
130. Kielbik, M., Szulc-Kielbik, I., & Klink, M. (2022). E-Cadherin Expression in Relation to Clinicopathological Parameters and Survival of Patients with Epithelial Ovarian Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(22). <https://doi.org/10.3390/ijms232214383>
131. Dai, C., Cao, J., Zeng, Y., Xu, S., Jia, X., & Xu, P. (2017). E-cadherin expression as a prognostic factor in patients with ovarian cancer: A meta-analysis. *Oncotarget*, 8(46), 81052-81061. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18898>
132. Xu, S., Dong, L., Qiu, W., Yang, L., Wang, X., & Liu, L. (2014). Construction and characteristics of an E-cadherin-related three-dimensional suspension growth model of ovarian cancer. *Scientific Reports*, 4. <https://doi.org/10.1038/srep05646>
133. Assidi, M. (2022). High N-Cadherin Protein Expression in Ovarian Cancer Predicts Poor Survival and Triggers Cell Invasion. *Frontiers in Oncology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.870820>
134. Belotti D, Paganoni P, Manenti L, Garofalo A, Marchini S, Taraboletti G, Giavazzi R. Matrix metalloproteinases (MMP9 and MMP2) induce the release of vascular endothelial growth factor (VEGF) by ovarian carcinoma cells: implications for ascites formation. *Cancer Res.* 2003 Sep 1;63(17):5224-9. PMID: 14500349.
135. Wang, S., Jia, J., Liu, D., Wang, M., Wang, Z., Li, X., Wang, H., Rui, Y., Liu, Z., Guo, W., Nie, J., & Dai, H. (2019). Matrix Metalloproteinase Expressions Play Important role in Prediction of Ovarian Cancer Outcome. *Scientific Reports*, 9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47871-5>

136. Pradeep, S., Kim, S. W., Wu, S. Y., Nishimura, M., Chaluvally-Raghavan, P., Miyake, T., Pecot, C. V., Kim, J., Choi, H. J., Bischoff, F. Z., Mayer, J. A., Huang, L., Nick, A. M., Hall, C. S., Rodriguez-Aguayo, C., Zand, B., Dalton, H. J., Arumugam, T., Jeong, L. H., Sood, A. K. (2014). Hematogenous metastasis of ovarian cancer: Rethinking mode of spread. *Cancer cell*, 26(1), 77. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.05.002>
137. Yeung L., Leung C. S., Yip P., Au Yeung C. L. C., Wong S. T. & Mok S. C. (2015). Cellular and molecular processes in ovarian cancer metastasis. A Review in the Theme: Cell and Molecular Processes in Cancer Metastasis. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 309(7). C444. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00188.2015>
138. Wójcik G, Piskorz J, Bulikowski W. Massive peritoneal cavity calcification in the course of advanced ovarian cancer: a case report. *Prz Menopauzalny*. 2015 Jun;14(2):149-51. doi: 10.5114/pm.2015.52156. Epub 2015 Jun 22. PMID: 26327904; PMCID: PMC4498033.
139. Iwagoi, Y., Motohara, T., Hwang, S., Fujimoto, K., Ikeda, T., & Katabuchi, H. (2021). Omental metastasis as a predictive risk factor for unfavorable prognosis in patients with stage III–IV epithelial ovarian cancer. *International Journal of Clinical Oncology*, 26(5), 995-1004. <https://doi.org/10.1007/s10147-021-01866-3>
140. Ying, F., Guo, J., Gao, X., Huang, L., Gao, L., Cai, J., & Wang, Z. (2023). Establishment of highly metastatic ovarian cancer model with omental tropism via in vivo selection. *IScience*, 26(5). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.106719>
141. Ma, X. (2020). The omentum, a niche for premetastatic ovarian cancer. *The Journal of Experimental Medicine*, 217(4). <https://doi.org/10.1084/jem.20192312>
142. Bahar SG, Rokkam VR. Omentum Tumors. [Updated 2023 Mar 16]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK563226/>



143. Etzerodt, A., Moulin, M., Doktor, T. K., Delfini, M., Mossadegh-Keller, N., Bajenoff, M., Sieweke, M. H., Moestrup, S. K., Auphan-Anezin, N., & Lawrence, T. (2020). Tissue-resident macrophages in omentum promote metastatic spread of ovarian cancer. *The Journal of Experimental Medicine*, 217(4). <https://doi.org/10.1084/jem.20191869>
144. Krishnan, V., Tallapragada, S., Schaar, B., Kamat, K., Chanana, A. M., Zhang, Y., Patel, S., Parkash, V., Rinker-Schaeffer, C., Folkins, A. K., Rankin, E. B., & Dorigo, O. (2020). Omental macrophages secrete chemokine ligands that promote ovarian cancer colonization of the omentum via CCR1. *Communications Biology*, 3. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01246-z>
145. Nieman, K. M., Kenny, H. A., Penicka, C. V., Ladanyi, A., Buell-Gutbrod, R., Zillhardt, M. R., Romero, I. L., Carey, M. S., Mills, G. B., Hotamisligil, G. S., Yamada, S. D., Peter, M. E., Gwin, K., & Lengyel, E. (2011). Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nature medicine*, 17(11), 1498. <https://doi.org/10.1038/nm.2492>
146. Motohara, T., Masuda, K., Morotti, M., Zheng, Y., El-Sahhar, S., Chong, K. Y., Wietek, N., Alsaadi, A., Carrami, E. M., Hu, Z., Artibani, M., Gonzalez, L. S., Katabuchi, H., Saya, H., & Ahmed, A. A. (2019). An evolving story of the metastatic voyage of ovarian cancer cells: Cellular and molecular orchestration of the adipose-rich metastatic microenvironment. *Oncogene*, 38(16), 2885-2898. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0637-x>
147. Jayraj AS, Kumar S, Bhatla N, Malik PS, Mathur S, Rangarajan K, Vanamail P, Thulkar S, Kumar L. Central nervous system metastasis from epithelial ovarian cancer- predictors of outcome. *Curr Probl Cancer*. 2023 Feb;47(1):100918. doi: 10.1016/j.currproblcancer.2022.100918. Epub 2022 Nov 30. PMID: 36502584.
148. Hyriavenko N, Lyndin M, Sikora V, Chyzhma R, Lyndina Y, Sikora K, Awuah WA, Romaniuk A. Neuroendocrine Tumor of the Fallopian Tube and

- Serous Adenocarcinoma of the Ovary: Multicentric Primary Tumors. *Turk Patoloji Derg.* 2023;39(2):161-166. doi: 10.5146/tjpath.2022.01589.
149. Чижма Р. А., Біденко М. В., Николенко А. П., Піддубний А. М., Москаленко Р. А. Патологічна біомінералізація при пухлинах яєчників. «Вістник проблем біології і медицини» Випуск 4 (158). 2020 рік . 43-48doi:10.29254/2077-4214-2020-4-158-43-48.
150. Chyzhma R.A., Soloviov N.O., Sikora V.V., Piddubnyi A.M. The role of psammoma bodies in the ovarian serous adenocarcinoma (literature review). *Biomedical Perspectives II: Abstract book of International Scientific Conference of Students. Postgraduates and Young Scientists. Sumy. October 20-22. 2020. – Sumy : Sumy State University. 2020 – 15.*
151. Чижма Р.А., Николенко А.П., Піддубний А.М., Москаленко Р.А. Аналіз захворюваності на злоякісні пухлини яєчників у Сумській області в 2014–2018 рр. *Морфологія.* 2021;15(1):73-8.
152. Chyzhma R, Piddubnyi A, Danilchenko S, Kravtsova O, Moskalenko R. Potential Role of Hydroxyapatite Nanocrystalline for Early Diagnostics of Ovarian Cancer. *Diagnostics.* 2021; 11(10):1741.
153. R. Chyzhma, A. Piddubnyi, A. Stepanenko, S. Danilchenko and R. Moskalenko. "Morphology of Nanocrystalline Calcifications of Ovarian Tumors." 2021 IEEE 11th International Conference Nanomaterials: Applications & Properties (NAP). 2021. pp. 1-4.
154. Чижма Р.А., Піддубний А.М., Степаненко А.О., Данильченко С.М., Москаленко Р.А. Морфологія патологічних біомінералів серозних карцином яєчників. Всеукраїнська міждисциплінарна науково-практична конференція з міжнародною участю «УМСА – століття інноваційних напрямків та наукових досягнень»; 2021 жовтень 8; Полтава. Полтава: Полтавський державний медичний університет; 2021. с 186-188.
155. Chyzhma R., Litvinec M., Moskalenko R. Morphometrical analysis of serous ovarian carcinoma with Psammoma Bodies. *Biomedical Perspectives III:*

- Abstract book of International Medical Conference. Sumy. October 26-28. 2021. – Sumy: Sumy State University. 2021(3): 92.
156. Ruslana Chyzhma, Roman Moskalenko. PROSPECTS FOR THE USE OF PATHOLOGICAL BIOMINERALIZATION IN THE DIAGNOSIS OF OVARIAN CANCER. The scientific paradigm in the context of technological development and social change: Scientific monograph. Part 2. Riga. Latvia: "Baltija Publishing". 2023. 464 p. ISBN: 978-9934-26-297-5.
157. Chyzhma R, Moskalenko R. Expression of Osteopontin in serous ovarian carcinoma. 35th European Congress of Pathology; 09–13 September 2023 (Dublin, Ireland); Berlin, Germany: Springer. *Virchows Archiv*: 2023;483(Suppl 1):S256.
158. Р.А. Чижма, Р.А. Москаленко. Імуногістохімічне дослідження раку яєчників з патологічною біомінералізацією. «Одеський медичний журнал», 2023 (4). doi: 10.32782/2226-2008-2023-4-7.
159. Чижма Р. А., Москаленко Р. А. Експресія остеобластичних маркерів в тканині раку яєчників з патологічною біомінералізацією. «Актуальні проблеми патологічної анатомії», 5-6 жовтня 2023 р., «Український науково-медичний молодіжний журнал», №4.
160. R. Chyzhma, R. Moskalenko. Search for "needles" of hydroxyapatite in the "haystack" of ovarian cancer. Twenty-third Annual Conference YUCOMAT 2022.
161. R. Chyzhma, A. Piddubnyi, A. Stepanenko, O. Pylypenko and R. Moskalenko. "The Study of the Nanocrystalline Structure of Psammoma Bodies of Serous Ovarian Carcinoma." 2022 IEEE 12th International Conference Nanomaterials: Applications & Properties (NAP). 2022.
162. R. Chyzhma and R. Moskalenko, "Trace Elements as a Specific Marker for Ovarian Cancer Biomineralization," 2023 IEEE 13th International Conference Nanomaterials: Applications & Properties (NAP), Bratislava, Slovakia, 2023, pp. NRA08-1-NRA08-4, doi: 10.1109/NAP59739.2023.10310855.

163. Fang, D., Chen, H., Zhu, J. Y., Wang, W., Teng, Y., Ding, F., Jing, Q., Su, B., & Huang, S. (2017). Epithelial-Mesenchymal Transition of Ovarian Cancer Cells Is Sustained by Rac1 through Simultaneous Activation of MEK1/2 and Src Signaling Pathways. *Oncogene*, 36(11), 1546. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.323>
164. Loret, N., Denys, H., Tummers, P., & Berx, G. (2019). The Role of Epithelial-to-Mesenchymal Plasticity in Ovarian Cancer Progression and Therapy Resistance. *Cancers*, 11(6). <https://doi.org/10.3390/cancers11060838>
165. Lampropoulou, D. I., Papadimitriou, M., Papadimitriou, C., Filippou, D., Kourlaba, G., Aravantinos, G., & Gazouli, M. (2023). The Role of EMT-Related lncRNAs in Ovarian Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(12). <https://doi.org/10.3390/ijms241210079>
166. Takai, M., Terai, Y., Kawaguchi, H., Ashihara, K., Fujiwara, S., Tanaka, T., Tsunetoh, S., Tanaka, Y., Sasaki, H., Kanemura, M., Tanabe, A., & Ohmichi, M. (2014). The EMT (epithelial-mesenchymal-transition)-related protein expression indicates the metastatic status and prognosis in patients with ovarian cancer. *Journal of Ovarian Research*, 7, 76. <https://doi.org/10.1186/1757-2215-7-76>
167. Piddubnyi A.M., Danylchenko S. M., Romaniuk A.M, Moskalenko I. R. A. // Prostatic calculi cause osteoblastic immunophenotype of prostate cancer / Pathology. – 2019. – T. 16, № 2(46). – C. 170–176.
168. Cyrta J, Benoist C, Masliah-Planchon J, Vieira AF, Pierron G, Fuhrmann L, Richardot C, Caly M, Leclere R, Mariani O, Da Maia E, Larousserie F, Féron JG, Carton M, Renault V, Bidard FC, Vincent-Salomon A. Breast carcinomas with osteoclast-like giant cells: a comprehensive clinicopathological and molecular portrait and evidence of RANK-L expression. *Mod Pathol*. 2022 Nov;35(11):1624-1635. doi: 10.1038/s41379-022-01112-9. Epub 2022 Jun 13. PMID: 35697931; PMCID: PMC9596373.
169. Guo, J., Yang, L., Pak, D., Celestino, J., Lu, K. H., Ning, J., Lokshin, A. E., Cheng, Z., & Lu, Z. (2019). Osteopontin, Macrophage Migration Inhibitory

- Factor and Anti-Interleukin-8 Autoantibodies Complement CA125 for Detection of Early Stage Ovarian Cancer. *Cancers*, 11(5).
170. Rani S., Sehgal A., Kaur J., Pandher D. K., & Punia R. S. (2022). Osteopontin as a Tumor Marker in Ovarian Cancer. *Journal of Mid-Life Health*, 13(3), 200-205. [https://doi.org/10.4103/jmh.jmh\\_52\\_22](https://doi.org/10.4103/jmh.jmh_52_22).
171. Zhao H, Chen Q, Alam A, Cui J, Suen KC, Soo AP, Eguchi S, Gu J, Ma D. The role of osteopontin in the progression of solid organ tumour. *Cell Death Dis*. 2018 Mar 2;9(3):356. doi: 10.1038/s41419-018-0391-6. PMID: 29500465; PMCID: PMC5834520.
172. Song G, Cai QF, Mao YB, Ming YL, Bao SD, Ouyang GL. Osteopontin promotes ovarian cancer progression and cell survival and increases HIF-1alpha expression through the PI3-K/Akt pathway. *Cancer Sci*. 2008 Oct;99(10):1901-7. doi: 10.1111/j.1349-7006.2008.00911.x. PMID: 19016748.
173. Zhang LL, Shao SL, Wu Y. [Expressions of osteopontin and B7-H4 in epithelial ovarian neoplasm and their significance]. *Chin J Cancer*. 2010 Jan;29(1):25-9. Chinese. PMID: 20038306.
174. Lane D., Matte I., Rancourt C., & Piché A. (2012). Osteoprotegerin (OPG) protects ovarian cancer cells from TRAIL-induced apoptosis but does not contribute to malignant ascites-mediated attenuation of TRAIL-induced apoptosis. *Journal of Ovarian Research*, 5, 34. <https://doi.org/10.1186/1757-2215-5-34>.
175. Lane D, Cartier A, L'Espérance S, Côté M, Rancourt C, Piché A. Differential induction of apoptosis by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in human ovarian carcinoma cells. *Gynecol Oncol*. 2004;93:594–604. doi: 10.1016/j.ygyno.2004.03.029.
176. Corey E, Brown LG, Kiefer JA, Quinn JE, Pitts TE, Blair JM, Vessella RL. Osteoprotegerin in prostate cancer bone metastasis. *Cancer Res*. 2005;65:1710–1718. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-2033.
177. Cuello M, Ettenberg SA, Nau MM, Lipkowitz S. Synergistic induction of apoptosis by the combination of TRAIL and chemotherapy in

- chemoresistant ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol*. 2001;**81**:380–390. doi: 10.1006/gyno.2001.6194.
178. Liu P, Mao H, Hou P. Synergistic antitumor effect of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand combined with cisplatin in ovarian carcinoma cell lines in vitro and in vivo. *Int J Gynecol Cancer*. 2006;**16**:538–548.
179. Goncharenko-Khaider N, Lane D, Matte I, Rancourt C, Piché A. The inhibition of Bid expression by Akt leads to resistance to TRAIL-induced apoptosis in ovarian cancer cells. *Oncogene*. 2010;**29**:5523–5536. doi: 10.1038/onc.2010.288.
180. Lane D, Matte I, Rancourt C, Piché A. The prosurvival activity of ascites against TRAIL is associated with a shorter disease-free interval in patients with ovarian cancer. *J Ovarian Res*. 2010;**3**:1. doi: 10.1186/1757-2215-3-1.
181. Tanos T, Sflomos G, Echeverria PC, Ayyanan A, Gutierrez M, Delaloye JF, Raffoul W, Fiche M, Dougall W, Schneider P, Yalcin-Ozuysal O, Brisken C. Progesterone/RANKL is a major regulatory axis in the human breast. *Sci Transl Med*. 2013 Apr 24;**5**(182):182ra55. doi: 10.1126/scitranslmed.3005654. PMID: 23616122.
182. Hu H, Wang J, Gupta A, Shidfar A, Branstetter D, Lee O, Ivancic D, Sullivan M, Chatterton RT Jr, Dougall WC, Khan SA. RANKL expression in normal and malignant breast tissue responds to progesterone and is up-regulated during the luteal phase. *Breast Cancer Res Treat*. 2014 Aug;**146**(3):515-23. doi: 10.1007/s10549-014-3049-9. Epub 2014 Jul 10. PMID: 25007964.
183. Sigl V, Owusu-Boaitey K, Joshi PA, Kavirayani A, Wirnsberger G, Novatchkova M, Kozieradzki I, Schramek D, Edokobi N, Hersl J, Sampson A, Odai-Afotey A, Lazaro C, Gonzalez-Suarez E, Pujana MA, Cimba F, Heyn H, Vidal E, Cruickshank J, Berman H, Sarao R, Ticevic M, Uribealago I, Tortola L, Rao S, Tan Y, Pfeiler G, Lee EY, Bago-Horvath Z, Kenner L, Popper H, Singer C, Khokha R, Jones LP, Penninger JM. RANKL/RANK control Brcal

- mutation- . Cell Res. 2016 Jul;26(7):761-74. doi: 10.1038/cr.2016.69. Epub 2016 May 31. PMID: 27241552; PMCID: PMC5129883.
184. Wieser V., Sprung S., Tsibulak I., Haybaeck J., Hackl H., Fiegl H., Marth C., & Zeimet A. G. (2019). Clinical Impact of RANK Signalling in Ovarian Cancer. *Cancers*, 11(6). <https://doi.org/10.3390/cancers11060791>
185. Feng J, Tang L. SPARC in Tumor Pathophysiology and as a Potential Therapeutic Target. *Curr Pharm Des.* 2014;20(39):6182-90. doi: 10.2174/1381612820666140619123255. PMID: 24947586.
186. Pan, K., Huang, X., & Jia, X. (2021). SPARC promotes pancreatic cancer cell proliferation and migration through autocrine secretion into the extracellular milieu. *Oncology Letters*, 21(6). <https://doi.org/10.3892/ol.2021.12746>
187. Shi, S., Ma, Y., Han, Y., Sang, Z., Yang, Y., & Zhang, G. (2022). Prognostic Significance of SPARC Expression in Breast Cancer: A Meta-Analysis and Bioinformatics Analysis. *BioMed Research International*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/8600419>
188. Alcaraz, L. B., Mallavialle, A., Mollevi, C., Mansouri, H., Chardès, T., Jacot, W., Turtoi, A., Roger, P., & Guiu, S. (2023). SPARC in cancer-associated fibroblasts is an independent poor prognostic factor in non-metastatic triple-negative breast cancer and exhibits pro-tumor activity. *International Journal of Cancer*, 152(6), 1243-1258. <https://doi.org/10.1002/ijc.34345>
189. Drev, D., Harpain, F., Beer, A., Stift, A., Gruber, E. S., Klimpfinger, M., Thalhammer, S., Reti, A., Kenner, L., Bergmann, M., & Marian, B. (2019). Impact of Fibroblast-Derived SPARC on Invasiveness of Colorectal Cancer Cells. *Cancers*, 11(10). <https://doi.org/10.3390/cancers11101421>
190. Said, N. A., Elmarakby, A. A., Imig, J. D., Fulton, D. J., & Motamed, K. (2008). SPARC Ameliorates Ovarian Cancer-Associated Inflammation. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 10(10), 1092-1104. <https://doi.org/10.1593/neo.08672>

191. Naczki, C., John, B., Patel, C., Lafferty, A., Ghoneum, A., Afify, H., White, M., Davis, A., Jin, G., Kridel, S., & Said, N. (2018). SPARC Inhibits Metabolic Plasticity in Ovarian Cancer. *Cancers*, *10*(10). <https://doi.org/10.3390/cancers10100385>
192. Socha MJ, Said N, Dai Y, Kwong J, Ramalingam P, Trieu V, Desai N, Mok SC, Motamed K. Aberrant promoter methylation of SPARC in ovarian cancer. *Neoplasia*. 2009 Feb;*11*(2):126-35. doi: 10.1593/neo.81146. PMID: 19177197; PMCID: PMC2631137.
193. Bull Phelps SL, Carbon J, Miller A, Castro-Rivera E, Arnold S, Brekken RA, Lea JS. Secreted protein acidic and rich in cysteine as a regulator of murine ovarian cancer growth and chemosensitivity. *Am J Obstet Gynecol*. 2009 Feb;*200*(2):180.e1-7. doi: 10.1016/j.ajog.2008.08.047. Epub 2008 Nov 6. PMID: 18992864; PMCID: PMC3709016.
194. Yiu, G. K., Chan, W. Y., Ng, W., Chan, P. S., Cheung, K. K., Berkowitz, R. S., & Mok, S. C. (2001). SPARC (Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine) Induces Apoptosis in Ovarian Cancer Cells. *The American Journal of Pathology*, *159*(2), 609-622. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)61732-4](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61732-4)
195. Crowley LC, Waterhouse NJ. Detecting Cleaved Caspase-3 in Apoptotic Cells by Flow Cytometry. *Cold Spring Harb Protoc*. 2016 Nov 1;*2016*(11). doi: 10.1101/pdb.prot087312. PMID: 27803251.
196. F., L., Baker, A. T., Pandya, U. M., Eisenhauer, E. L., & Rueda, B. R. (2019). Understanding and Targeting Apoptotic Pathways in Ovarian Cancer. *Cancers*, *11*(11), 1631. <https://doi.org/10.3390/cancers11111631>
197. Feng X, Yu Y, He S, Cheng J, Gong Y, Zhang Z, Yang X, Xu B, Liu X, Li CY, Tian L, Huang Q. Dying glioma cells establish a proangiogenic microenvironment through a caspase 3 dependent mechanism. *Cancer Lett*. 2017 Jan 28;*385*:12-20. doi: 10.1016/j.canlet.2016.10.042. Epub 2016 Nov 5. PMID: 27826040; PMCID: PMC5323266.
198. Zhou M, Liu X, Li Z, Huang Q, Li F, Li CY. Caspase-3 regulates the migration, invasion and metastasis of colon cancer cells. *Int J Cancer*. 2018 Aug



- 15;143(4):921-930. doi: 10.1002/ijc.31374. Epub 2018 Mar 30. PMID: 29524226; PMCID: PMC6204286.
199. Friedl P, Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer*. 2003 May;3(5):362-74. doi: 10.1038/nrc1075. PMID: 12724734.
200. Cui L, Zhao Y, Pan Y, Zheng X, Shao D, Jia Y, He K, Li K, Chen L. Chemotherapy induces ovarian cancer cell repopulation through the caspase 3-mediated arachidonic acid metabolic pathway. *Onco Targets Ther*. 2017 Dec 8;10:5817-5826. doi: 10.2147/OTT.S150456. Erratum in: *Onco Targets Ther*. 2022 Dec 05;15:1503-1504. PMID: 29263678; PMCID: PMC5726368.
201. Zhou, Z., Xu, S., Jiang, L., Tan, Z., & Wang, J. (2022). A Systematic Pan-Cancer Analysis of CASP3 as a Potential Target for Immunotherapy. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.776808>
202. Bernard A, Chevrier S, Beltjens F, Dosset M, Viltard E, Lagrange A, Derangère V, Oudot A, Ghiringhelli F, Collin B, Apetoh L, Feron O, Chen S, Arnould L, Végran F, Boidot R. Cleaved Caspase-3 Transcriptionally Regulates Angiogenesis-Promoting Chemotherapy Resistance. *Cancer Res*. 2019 Dec 1;79(23):5958-5970. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-19-0840. Epub 2019 Oct 14. PMID: 31611309.
203. Zhang J, Li S, Liu F, Yang K. Role of CD68 in tumor immunity and prognosis prediction in pan-cancer. *Sci Rep*. 2022 May 12;12(1):7844. doi: 10.1038/s41598-022-11503-2. PMID: 35550532; PMCID: PMC9098459.
204. Jamiyan, T., Kuroda, H., Yamaguchi, R., Abe, A., & Hayashi, M. (2020). CD68- and CD163-positive tumor-associated macrophages in triple negative cancer of the breast. *Virchows Archiv*, 477(6), 767-775. <https://doi.org/10.1007/s00428-020-02855-z>
205. Chen Y, Klingen TA, Aas H, Wik E, Akslen LA. CD47 and CD68 expression in breast cancer is associated with tumor-infiltrating lymphocytes, blood vessel invasion, detection mode, and prognosis. *J Pathol Clin Res*. 2023

- May;9(3):151-164. doi: 10.1002/cjp2.309. Epub 2023 Jan 4. PMID: 36598153; PMCID: PMC10073931.
206. Tan, Y., Wang, M., Zhang, Y., Ge, S., Zhong, F., Xia, G., & Sun, C. (2021). Tumor-Associated Macrophages: A Potential Target for Cancer Therapy. *Frontiers in Oncology, 11*. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.693517>
207. Schweer, D., McAtee, A., Neupane, K., Richards, C., Ueland, F., & Kolesar, J. (2022). Tumor-Associated Macrophages and Ovarian Cancer: Implications for Therapy. *Cancers, 14*(9). <https://doi.org/10.3390/cancers14092220>
208. Boyde A, Sela J. Scanning electron microscope study of separated calcospherites from the matrices of different mineralizing systems. *Calcif Tissue Res.* 1978 Nov 10;26(1):47-9. doi: 10.1007/BF02013233. PMID: 104778.
209. Lossow, K., Schwarz, M., & Kipp, A. P. (2021). Are trace element concentrations suitable biomarkers for the diagnosis of cancer? *Redox Biology, 42*. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.101900>
210. Caglayan A, Katlan DC, Tuncer ZS, Yüce K. Evaluation of trace elements associated with antioxidant enzymes in blood of primary epithelial ovarian cancer patients. *J Trace Elem Med Biol.* 2019 Mar;52:254-262. doi: 10.1016/j.jtemb.2019.01.010. Epub 2019 Jan 16. PMID: 30732891.
211. Guo, Y., Lu, Y., & Jin, H. (2020). Appraising the role of circulating concentrations of micro-nutrients in epithelial ovarian cancer risk: A Mendelian randomization analysis. *Scientific Reports, 10*. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63909-5>
212. Granato T, Manganaro L, Petri L, Porpora MG, Viggiani V, Angeloni A, Anastasi E. Low 25-OH vitamin D levels at time of diagnosis and recurrence of ovarian cancer. *Tumour Biol.* 2016 Feb;37(2):2177-81. doi: 10.1007/s13277-015-4055-1. Epub 2015 Sep 9. PMID: 26349750.
213. Bailey, K. A., Klymenko, Y., Feist, P. E., Hummon, A. B., Stack, M. S., & Schultz, Z. D. (2017). Chemical Analysis of Morphological Changes in

- Lysophosphatidic Acid-Treated Ovarian Cancer Cells. *Scientific Reports*, 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15547-7>
214. Zhang, R., Zhao, G., Shi, H., Zhao, X., Wang, B., Dong, P., Watari, H., Pfeffer, L. M., & Yue, J. (2020). Zinc regulates primary ovarian tumor growth and metastasis through the epithelial to mesenchymal transition. *Free radical biology & medicine*, 160, 775. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.09.010>
215. Padmanabhan A, Kaushik M, Niranjana R, Richards JS, Ebricht B, Venkatasubbu GD. Zinc Oxide nanoparticles induce oxidative and proteotoxic stress in ovarian cancer cells and trigger apoptosis Independent of p53-mutation status. *Appl Surf Sci*. 2019 Sep;487:807-818. doi: 10.1016/j.apsusc.2019.05.099. PMID: 32042215; PMCID: PMC7009796.
216. Zhao, S., Zhang, X., Gao, F., Chi, H., Zhang, J., Xia, Z., Cheng, C., & Liu, J. (2023). Identification of copper metabolism-related subtypes and establishment of the prognostic model in ovarian cancer. *Frontiers in Endocrinology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1145797>
217. Lin S, Yang H. Ovarian cancer risk according to circulating zinc and copper concentrations: A meta-analysis and Mendelian randomization study. *Clin Nutr*. 2021 Apr;40(4):2464-2468. doi: 10.1016/j.clnu.2020.10.011. Epub 2020 Oct 14. PMID: 33129595.
218. Michalczyk, K., & Cymbaluk-Płoska, A. (2020). The Role of Zinc and Copper in Gynecological Malignancies. *Nutrients*, 12(12). <https://doi.org/10.3390/nu12123732>
219. Basuli, D., Tesfay, L., Deng, Z., Paul, B., Yamamoto, Y., Ning, G., Xian, W., McKeon, F., Lynch, M., Crum, C. P., Hegde, P., Brewer, M., Wang, X., Miller, L. D., Dymant, N., Torti, F. M., & Torti, S. V. (2017). Iron addiction: A novel therapeutic target in ovarian cancer. *Oncogene*, 36(29), 4089. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.11>
220. Zhang H, Li J, Hu Y, Shen M, Shi X, Zhang G. Folic acid-targeted iron oxide nanoparticles as contrast agents for magnetic resonance imaging of

- human ovarian cancer. *J Ovarian Res.* 2016 Mar 29;9:19. doi: 10.1186/s13048-016-0230-2. PMID: 27025582; PMCID: PMC4812633.
221. Torti SV, Torti FM. Iron and Cancer: 2020 Vision. *Cancer Res.* 2020 Dec 15;80(24):5435-5448. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-20-2017. Epub 2020 Sep 14. PMID: 32928919; PMCID: PMC8118237.
222. Liu, W., Qdaisat, A., Soliman, P. T., Ramondetta, L., Lopez, G., Narayanan, S., Zhou, S., Cohen, L., Bruera, E., & Yeung, C. J. (2019). Hypomagnesemia and Survival in Patients with Ovarian Cancer Who Received Chemotherapy with Carboplatin. *The Oncologist*, 24(6), e312. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2018-0465>
223. Leidi M, Wolf F, Maier JAM. Magnesium and cancer: more questions than answers. In: Vink R, Nechifor M, editors. *Magnesium in the Central Nervous System* [Internet]. Adelaide (AU): University of Adelaide Press; 2011. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507261/>
224. Zhao J, Giri A, Zhu X, Shrubsole MJ, Jiang Y, Guo X, Ness R, Seidner DL, Giovannucci E, Edwards TL, Dai Q. Calcium: magnesium intake ratio and colorectal carcinogenesis, results from the prostate, lung, colorectal, and ovarian cancer screening trial. *Br J Cancer.* 2019 Oct;121(9):796-804. doi: 10.1038/s41416-019-0579-2. Epub 2019 Sep 23. PMID: 31543516; PMCID: PMC6889387.
225. Blair H.C., Larrouture Q.C., Li Y., Lin H., Beer-Stoltz D., Liu L., Tuan R.S., Robinson L.J., Schlesinger P.H., Nelson D.J. Osteoblast differentiation and bone matrix formation in vivo and in vitro. *Tissue Eng. Part B Rev.* 2017;23:268–280. doi: 10.1089/ten.teb.2016.0454.
226. Florencio-Silva R., Sasso G.R.D.S., Sasso-Cerri E., Simões M.J., Cerri P.S. Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. *BioMed Res. Int.* 2015;2015:421746. doi: 10.1155/2015/421746.
227. Yu J.-K., Pan H., Huang S.-M., Huang N.-L., Yao C.-C., Hsiao K.-M., Wu C.-W. Calcium content of different compositions of gallstones and

- pathogenesis of calcium carbonate gallstones. *Asian J. Surg.* 2013;36:26–35. doi: 10.1016/j.asjsur.2012.06.001.
228. Liu C., Li S., Kong J., Liu Y., Wang T., Xie L., Zhang R. In-depth proteomic analysis of shell matrix proteins of *Pinctada fucata*. *Sci. Rep.* 2015;5:17269. doi: 10.1038/srep17269.
229. Boskey A.L. Bone composition: Relationship to bone fragility and antiosteoporotic drug effects. *BoneKEy Rep.* 2013;2:447. doi: 10.1038/bonekey.2013.181.
230. Omelon S., Ariganello M., Bonucci E., Grynepas M., Nanci A. A review of phosphate mineral nucleation in biology and geobiology. *Calcif. Tissue Int.* 2013;93:382–396. doi: 10.1007/s00223-013-9784-9.
231. Sroga G.E., Vashishth D. Effects of bone matrix proteins on fracture and fragility in osteoporosis. *Curr. Osteoporos. Rep.* 2012;10:141–150. doi: 10.1007/s11914-012-0103-6.
232. Bertazzo S., Gentleman E., Cloyd K.L., Chester A.H., Yacoub M.H., Stevens M.M. Nano-analytical electron microscopy reveals fundamental insights into human cardiovascular tissue calcification. *Nat. Mater.* 2013;12:576–583. doi: 10.1038/nmat3627.
233. Kolomiiets O., Piddubnyi A., Moskalenko R. and Stepanenko A. The Structure of Nano-crystalline Apatite From the Breast Cancer. 2022 IEEE 12th International Conference Nanomaterials: Applications & Properties (NAP), 2022, pp. NRA04-1-NRA04-4, doi: 10.1109/NAP55339.2022.9934287
234. Casanova M.F., Araque J.M. Mineralization of the basal ganglia: Implications for neuropsychiatry, pathology and neuroimaging. *Psychiatry Res.* 2003;121:59–87. doi: 10.1016/S0165-1781(03)00202-6.
235. Rockhill J., Mrugala M., Chamberlain M.C. Intracranial meningiomas: An overview of diagnosis and treatment. *Neurosurg. Focus.* 2007;23:E1. doi: 10.3171/FOC-07/10/E1.

## ДОДАТКИ

## Додаток А1



ЗАТВЕРДЖУЮ

Перший проректор

Сергій ЛЕОНОВ

20 жовтня 2023 р.

впровадження (використання) результатів  
науково-дослідної роботи (етапу НДР)/ дисертаційної роботи у навчальний процес

«Патоморфологічна характеристика біомінералізації при злоякісних новоутвореннях яєчників»,  
яка виконана в період з 01 жовтня 2021 р. по 30 грудня 2023 р.

У ході проведення дисертаційного дослідження було встановлено, що розвиток біомінералізації починається на ранніх етапах канцерогенезу, що має важливе значення саме в ранній діагностиці пухлин яєчників. Біомінерали розміром більше 200 мкм візуалізуються за допомогою ультразвукового дослідження. Встановлено достовірно вищий рівень імуногістохімічної експресії остеопонтину у групі раку яєчників з біомінералізацією. Виявлено сполуки кальцій фосфату в складі патологічних біомінералів. За співвідношенням Са/Р патологічних біомінералів пухлинної тканини раку яєчників відповідають зрілому гідроксиапатиту, що дозволяє розглядати даний феномен у якості потенційної діагностичної ознаки для ранньої діагностики раку яєчників.

Здобувач наукового ступеня доктора філософії:

Руслана ЧИЖМА

Комісія в складі:

Голова комісії: голова ради з якості ННМІ

Вікторія ПЕТРАШЕНКО

Члени комісії:

- гарант освітньої програми ОПН 222, Медицина (доктор філософії)      Юрій АТАМАН
- завідувач кафедри онкології та радіології СумДУ      Ігор ВИННИЧЕНКО
- начальник ЦККНО «Біомедичний дослідницький центр»      Максим ПОГОРЕЛОВ

Встановила, впровадження в навчальний процес результатів дисертаційного дослідження та використання їх при викладанні дисциплін «Онкологія», «Патоморфологія», «Гінекологія», «Методологія та методи наукових досліджень», «Біологічна та імунологічні методи діагностики в терапії та хірургії за міжнародними стандартами» та «Застосування європейської освіти для медичної галузі України: Біоматеріали» у практичних заняттях для здобувачів вищої освіти ОПН 222 «Медицина» (доктор філософії).

“09” жовтня 2023 р.

Голова комісії:

Вікторія ПЕТРАШЕНКО

Члени комісії:

Юрій АТАМАН

Ігор ВИННИЧЕНКО

Максим ПОГОРЕЛОВ

## Додаток А2

ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор

з науково-педагогічної роботи

Харківського національного

університету імені В. Н. Каразіна

МІЩЕНКО Т. А. ТЕЛЕЙМОНОВ



2023 р.

## АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції** (метод профілактики, діагностики, лікування, пристрій, форма організаційної роботи та ін.): рання діагностична ознака раку яєчників на основі структурно-фазового аналізу патологічних біомінералів.
2. **Ким і коли запропонований**: Сумський державний університет, кафедра патологічної анатомії, асп. Чижма Р.А., проф. Москаленко Р.А. (40007, м. Суми, вул. Марко Вовчок, 2), впродовж вересня-грудня 2023 року.
3. **Джерела інформації** (методичні рекомендації, інформаційний лист, звіт про НДР, дисертація, монографія, з'їзди, конференції, семінари та ін.): Chyzhna R, Piddubnyi A, Danilchenko S, Kravtsova O, Moskalenko R. Potential Role of Hydroxyapatite Nanocrystalline for Early Diagnostics of Ovarian Cancer. *Diagnostics* (Basel). 2021 Sep 22;11(10):1741. doi: 10.3390/diagnostics11101741. PMID: 34679439; PMCID: PMC8534774.
4. **Де і коли впроваджено**: кафедра загальної та клінічної патології Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна.
5. **Результати застосування методу за період з вересня 2023 року по грудень 2023 року**: впровадження у навчальний процес на кафедрі загальної та клінічної патології Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна в лекційному курсі, при проведенні практичних занять зі студентами, лікарями-інтернами, клінічними ординаторами та аспірантами, а також у науково-дослідну роботу кафедри.
6. **Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелі інформації (п.3)**: поглиблення знань студентів, лікарів-інтернів, клінічних ординаторів та аспірантів з питань патоморфологічних характеристик раку яєчників з біомінералізацією.
7. **Зауваження, пропозиції**: не має.

Відповідальна за впровадження:  
завідуюча кафедрою загальної та  
клінічної патології  
Харківського національного  
університету імені В. Н. Каразіна,  
д.мед.н, професор

Олена ПРОЦЕНКО

## Додаток АЗ

ЗАТВЕРДЖУЮ

Перший проректор

Національного університету охорони

здоров'я України імені П.Л. Шупика

імені-кореспондент НАМН України,

професор

Юрій ВДОВИЧЕНКО

2023р.



## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції:** у ході проведення дисертаційного дослідження було встановлено, що за співвідношенням Са/P патологічних біомінералів пухлинної тканини раку яєчників відповідають зрілому гідроксиапатиту, що дозволяє розглядати цей феномен у якості потенційної діагностичної ознаки для ранньої діагностики раку яєчників.
2. **Ким і коли запропонований:** Сумський державний університет, кафедра патологічної анатомії, асп. Чижма Р.А., проф. Москаленко Р.А. (40007, м. Суми, вул. Марко Вовчок, 2), впродовж квітня-вересня 2023 року.
3. **Джерела інформації:** Chyzhma R, Pidubnyi A, Danilchenko S, Kravtsova O, Moskalenko R. Potential Role of Hydroxyapatite Nanocrystalline for Early Diagnostics of Ovarian Cancer. *Diagnostics* (Basel). 2021 Sep 22;11(10):1741. doi: 10.3390/diagnostics11101741. PMID: 34679439; PMCID: PMC8534774.
4. **Де і коли впроваджено:** кафедра морфології, клінічної патології та судової медицини Національного університету охорони здоров'я України ім. П.Л. Шупика.
5. **Результати застосування методу за період з квітня 2023 року по вересень 2023 року:** впровадження у навчальний процес на кафедрі морфології, клінічної патології та судової медицини Національного університету охорони здоров'я України імені П.Л. Шупика в лекційному курсі, при проведенні практичних занять з лікарями-інтернами, лікарями-патологоанатомами, а також у науково-дослідну роботу кафедри.
6. **Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелі інформації:** поглиблення знань лікарів-інтернів, лікарів-патологоанатомів з питань патоморфологічних характеристик раку яєчників з біомінералізацією.
7. **Зауваження, пропозиції:** не має.

Пропозиція обговорена та затверджена на навчально-методичній нараді кафедри морфології, клінічної патології та судової медицини НУОЗ України імені П.Л. Шупика (протокол № 9 від 25 вересня 2023 р.).

Відповідальна за впровадження:  
завідувачка кафедри морфології, клінічної  
патології та судової медицини НУОЗ  
України імені П.Л. Шупика  
професор

Олена ДЯДИК



## Додаток А4

ЗАТВЕРДЖУЮ

Перший проректор  
з науково-педагогічної роботиПолтавського державного  
медичного університету

Дворник В.М.



« \_\_\_\_\_ 2023 р.

## АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції** (метод профілактики, діагностики, лікування, пристрій, форма організаційної роботи та ін.): у ході проведення дисертаційного дослідження було встановлено, що за співвідношенням Ca/P патологічних біомінералів пухлинної тканини раку яєчників відповідають зрілому гідроксиапатиту, що дозволяє розглядати цей феномен у якості потенційної діагностичної ознаки для ранньої діагностики раку яєчників.
2. **Ким і коли запропонований:** Сумський державний університет, кафедра патологічної анатомії, асп. Чижма Р.А., проф. Москаленко Р.А. (40007, м. Суми, вул. Марко Вовчок, 2), впродовж вересня-грудня 2023 року.
3. **Джерела інформації** (методичні рекомендації, інформаційний лист, звіт про НДР, дисертація, монографія, з'їзди, конференції, семінари та ін.): Chyzhma R, Piddubnyi A, Danilchenko S, Kravtsova O, Moskalenko R. Potential Role of Hydroxyapatite Nanocrystalline for Early Diagnostics of Ovarian Cancer. *Diagnostics* (Basel). 2021 Sep 22;11(10):1741. doi: 10.3390/diagnostics11101741. PMID: 34679439; PMCID: PMC8534774.
4. **Де і коли введено:** кафедра патологічної анатомії та судової медицини Полтавського державного медичного університету.
5. **Результати застосування методу за період з вересня 2023 року по грудень 2023 року:** впровадження у навчальний процес на кафедрі патологічної анатомії та судової медицини Полтавського державного медичного університету в лекційному курсі, при проведенні практичних занять зі студентами, лікарями-інтернами, а також у науково-дослідну роботу кафедри.
6. **Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелі інформації (п.3):** поглиблення знань студентів, лікарів-інтернів з питань патоморфологічних характеристик раку яєчників з біомінералізацією.
7. **Зауваження, пропозиції:** не має.

*Пропозиція обговорена і затверджена на кафедральному засіданні №11 від.02.02.2023.*

Відповідальний за впровадження  
завідувач кафедри патологічної  
анатомії та судової медицини  
Полтавського державного медичного  
університету  
д.мед.н., професор

І.І. Старченко

## Додаток А5

ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор закладу вищої освіти  
з науково-педагогічної роботи Буковинського  
державного медичного університету  
Доцент  Володимир ХОДОРОВСЬКИЙ

« 3 » грудня 2023 року



## АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції** (метод профілактики, діагностики, лікування, пристрій, форма організаційної роботи та ін.): у ході проведення дисертаційного дослідження було встановлено, що за співвідношенням Ca/P патологічних біомінералів пухлинної тканини раку яєчників відповідають зрілому гідроксиапатиту, що дозволяє розглядати цей феномен у якості потенційної діагностичної ознаки для ранньої діагностики раку яєчників.
2. **Ким і коли запропонований:** Сумський державний університет, кафедра патологічної анатомії, асп. Чижма Р.А., проф. Москаленко Р.А. (40007, м. Суми, вул. Марко Вовчок, 2), впродовж березня-червня 2023 року.
3. **Джерела інформації** (методичні рекомендації, інформаційний лист, звіт про НДР, дисертація, монографія, з'їзди, конференції, семінари та ін.): Chyzhma R, Piddubnyi A, Danilenko S, Kravtsova O, Moskalenko R. Potential Role of Hydroxyapatite Nanocrystalline for Early Diagnostics of Ovarian Cancer. **Diagnostics** (Basel). 2021 Sep 22;11(10):1741. doi: 10.3390/diagnostics11101741. PMID: 34679439; PMCID: PMC8534774.
4. **Де і коли впроваджено:** кафедра патологічної анатомії Буковинського державного медичного університету.
5. **Результати застосування методу за період з вересня 2023 року по грудень 2023 року:** впровадження у навчальний процес на кафедрі патологічної анатомії Буковинського державного медичного університету в лекційному курсі, при проведенні практичних занять зі студентами, лікарями-інтернами, клінічними ординаторами та аспірантами, а також у науково-дослідну роботу кафедри.
6. **Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелі інформації (п.3):** поглиблення знань студентів, лікарів-інтернів, клінічних ординаторів та аспірантів з питань патоморфологічних характеристик раку яєчників з біомінералізацією.
7. **Зауваження, пропозиції:** немає.

Відповідальний за впровадження:  
завідувач кафедри патологічної  
анатомії БДМУ



професор Ігор ДАВИДЕНКО

## Додаток А6

ЗАТВЕРДЖУЮ

Директор медичного центру

«ФЛОРІС-С»

Г.І. Гапачук



\_\_\_\_\_

28 вересня 2023р.

## АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції** (метод профілактики, діагностики, лікування, пристрій, форма організаційної роботи та ін.): структурні та ультразвукові ознаки патологічних біомінералів раку яєчників в ранній та диференціальній діагностиці пухлинного процесу.
2. **Ким і коли запропонований:** Сумський державний університет, кафедра патологічної анатомії, асп. Чижма Р.А., проф. Москаленко Р.А. (40007, м. Суми, вул. Марко Вовчок, 2), впродовж вересня-грудня 2023 року.
3. **Джерела інформації** (методичні рекомендації, інформаційний лист, звіт про НДР, дисертація, монографія, з'їзди, конференції, семінари та ін.): **Chyzhma R.** Piddubnyi A. Danilchenko S, Kravtsova O, Moskalenko R. Potential Role of Hydroxyapatite Nanocrystalline for Early Diagnostics of Ovarian Cancer. **Diagnostics** (Basel). 2021 Sep 22;11(10):1741. doi: 10.3390/diagnostics11101741. PMID: 34679439; PMCID: PMC8534774.
4. **Впроваджено:** у діагностичну та клінічну роботу гінекологічного відділення «Клініки жіночого здоров'я» медичного центру «ФЛОРІС-С».
5. **Включено:** у практичну роботу гінекологічного відділення «Клініки жіночого здоров'я» медичного центру «ФЛОРІС-С».
6. **Результати застосування методу:** впроваджено у роботу гінекологічного відділення «Клініки жіночого здоров'я» медичного центру «ФЛОРІС-С».
7. **Термін впровадження:** вересень-грудень 2023 року.
8. **Базова установа, яка проводить впровадження:** «Клініка жіночого здоров'я» медичного центру «ФЛОРІС-С».
9. **Зауваження, пропозиції:** не має.

Відповідальна за впровадження  
завідувач гінекологічного  
відділення «Клініки жіночого  
здоров'я» медичного центру  
«ФЛОРІС-С»

\_\_\_\_\_

Ю.В. Булава



## ДОДАТОК А8

ЗАТВЕРДЖУЮ

Директор медичного центру  
хірургічного профілю «НАДІЯ»


А.В. Курочка



2023р.

## АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції** (метод профілактики, діагностики, лікування, пристрій, форма організаційної роботи та ін.): структурні та ультразвукові ознаки патологічних біомінералів раку яєчників в ранній діагностиці та диференціації пухлинного процесу.
2. **Ким і коли запропонований:** Сумський державний університет, кафедра патологічної анатомії, асп. Чижма Р.А., проф. Москаленко Р.А. (40007, м. Суми, вул. Марко Вовчок, 2), впродовж вересня-грудня 2023 року.
3. **Джерела інформації** (методичні рекомендації, інформаційний лист, звіт про НДР, дисертація, монографія, з'їзди, конференції, семінари та ін.): **Chyzhma R, Piddubnyi A, Danilchenko S, Kravtsova O, Moskalenko R. Potential Role of Hydroxyapatite Nanocrystalline for Early Diagnostics of Ovarian Cancer. *Diagnostics* (Basel). 2021 Sep 22;11(10):1741. doi: 10.3390/diagnostics11101741. PMID: 34679439; PMCID: PMC8534774.**
4. **Впроваджено:** у діагностичну роботу медичного центру хірургічного профілю «НАДІЯ».
5. **Включено:** у практичну роботу відділення хірургії медичного центру хірургічного профілю «НАДІЯ».
6. **Результати застосування методу:** впроваджено у роботу відділення хірургії медичного центру хірургічного профілю «НАДІЯ».
7. **Термін впровадження:** вересень-грудень 2023 року.
8. **Базова установа, яка проводить впровадження:** медичний центр хірургічного профілю «НАДІЯ».
9. **Зауваження, пропозиції:** не має.

Відповідальний за впровадження  
завідувач відділення хірургії
  
 Д.В. Муравський

## ДОДАТОК Б

Таблиця 1. Основна група. Пухлини яєчників з ознаками біомінералізації.

| Випадок | Вік | TNM |    |    | Діаметр<br>(пухлина),м<br>м | УЗД<br>(кальцифікат),м<br>м |
|---------|-----|-----|----|----|-----------------------------|-----------------------------|
|         |     | T   | N  | M  |                             |                             |
| 1       | 44  | T1  | N0 | M0 | 2                           | 0.5                         |
| 2       | 59  | T2  | N1 | M0 | 10                          | 1.0                         |
| 3       | 30  | T1  | N0 | M0 | 1                           | 0.25                        |
| 4       | 59  | T2  | N0 | M0 | 10                          | 1.0                         |
| 5       | 57  | T2  | N1 | M1 | 10                          | 2.0                         |
| 6       | 44  | T3  | N1 | M1 | 15                          | 2.0                         |
| 7       | 57  | T1  | N0 | M0 | 5                           | 1.0                         |
| 8       | 65  | T1  | N0 | M0 | 3                           | 0.5                         |
| 9       | 48  | T3  | N1 | M1 | 15                          | 2.0                         |
| 10      | 37  | T2  | N0 | M0 | 10                          | 0.8                         |
| 11      | 58  | T1  | N0 | M0 | 5                           | 1.0                         |
| 12      | 52  | T2  | N0 | M0 | 10                          | 1.0                         |
| 13      | 77  | T1  | N0 | M0 | 2                           | 0.5                         |
| 14      | 51  | T2  | N1 | M0 | 10                          | 1.0                         |
| 15      | 56  | T1  | N0 | M0 | 2                           | 0.5                         |
| 16      | 50  | T2  | N0 | M0 | 10                          | 1.0                         |
| 17      | 58  | T3  | N1 | M1 | 20                          | 3.0                         |
| 18      | 46  | T2  | N0 | M0 | 10                          | 1.0                         |
| 19      | 55  | T2  | N0 | M0 | 10                          | 1.0                         |
| 20      | 43  | T2  | N1 | M0 | 15                          | 2.0                         |
| 21      | 69  | T3  | N1 | M1 | 20                          | 4.0                         |
| 22      | 66  | T1  | N0 | M0 | 5                           | 1.0                         |
| 23      | 57  | T2  | N1 | M0 | 10                          | 2.0                         |
| 24      | 53  | T4  | N1 | M1 | 25                          | 4.0                         |
| 25      | 72  | T3  | N1 | M1 | 15                          | 3.0                         |
| 26      | 64  | T1  | N0 | M0 | 5                           | 1.0                         |
| 27      | 50  | T2  | N1 | M0 | 10                          | 2.0                         |
| 28      | 54  | T1  | N0 | M0 | 2                           | 1.0                         |
| 29      | 63  | T3  | N1 | M1 | 15                          | 2.0                         |
| 30      | 57  | T2  | N0 | M0 | 10                          | 1.0                         |

Таблиця 2. Контрольна група. Пухлини яєчників без ознак кальцифікації.

| Випадок | Вік | TNM |    |    | Діаметр<br>(пухлина),<br>мм |
|---------|-----|-----|----|----|-----------------------------|
|         |     | T   | N  | M  |                             |
| 1       | 60  | T3c | N1 | M0 | 21                          |
| 2       | 50  | T4  | N1 | M1 | 80                          |
| 3       | 33  | T1a | N1 | M0 | 20                          |
| 4       | 48  | T3c | N1 | M0 | 90                          |
| 5       | 39  | T3c | N1 | M0 | 70                          |
| 6       | 64  | T2b | N1 | M0 | 60                          |
| 7       | 77  | T2a | N1 | M0 | 60                          |
| 8       | 68  | T2b | N1 | M1 | 15                          |
| 9       | 48  | T2a | N0 | M0 | 20                          |
| 10      | 64  | T1b | N0 | M0 | 50                          |
| 11      | 33  | T1c | N0 | M0 | 20                          |
| 12      | 56  | T3c | N1 | M0 | 30                          |
| 13      | 55  | T2a | N0 | M0 | 25                          |
| 14      | 66  | T1c | Nx | M0 | 100                         |
| 15      | 49  | T1  | Nx | M0 | 20                          |
| 16      | 44  | T2c | N1 | M0 | 45                          |
| 17      | 51  | T3c | N1 | M0 | 5                           |
| 18      | 39  | T3b | N1 | M0 | 10                          |
| 19      | 57  | T3c | N1 | M0 | 35                          |
| 20      | 36  | T2  | N0 | M0 | 10                          |
| 21      | 46  | T3a | N1 | M0 | 20                          |
| 22      | 49  | T3b | N1 | M0 | 6                           |
| 23      | 52  | T1a | Nx | M0 | 60                          |
| 24      | 45  | T1a | N0 | M0 | 10                          |
| 25      | 59  | T3c | N1 | M1 | 10                          |
| 26      | 73  | T1a | N0 | M0 | 40                          |
| 27      | 54  | T3a | N1 | M0 | 15                          |
| 28      | 62  | T1c | Nx | M0 | 80                          |
| 29      | 45  | T3c | N1 | M0 | 120                         |
| 30      | 63  | T2a | N0 | M0 | 45                          |

*Таблиця 3. Рівень захворюваності на злоякісні новоутворення яєчників в Україні та Сумській області.  $X_c$  – середній показник захворюваності за 2014–2022 роки;  $\sigma$  – стандартне відхилення;  $Me$  – медіана;  $\mu$  – середня похибка.*

|                     | 2014 | 2015 | 2016 | 2017 | 2018 | 2019 | 2020 | 2021 | $X_c$ | $\Sigma$ | $Me$  | $\mu$ |
|---------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|----------|-------|-------|
| <b>Україна</b>      | 11.5 | 11.5 | 11.1 | 11   | 11.3 | 11.6 | 10.2 | 10.3 | 11.06 | 0.54     | 11.20 | 0.19  |
| <b>Сумська обл.</b> | 11.1 | 11.9 | 11.8 | 10.4 | 12.5 | 12.7 | 9.9  | 10.4 | 11.33 | 1.04     | 11.45 | 0.37  |



Таблиця 4. Вікові показники захворюваності впродовж 2014–2021 рр.(на 100 тис. жіночого населення)

|              | 2014 | 2015 | 2016 | 2017 | 2018 | 2019 | 2020 | 2021 |
|--------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| <b>0+</b>    | 0.5  | 0.5  | 1.6  | –    | –    | –    | –    | 0.8  |
| <b>1-4</b>   | –    | 0.1  | 0.1  | 0.3  | 0.1  | –    | –    | –    |
| <b>5-9</b>   | 0.4  | 0.4  | 0.3  | 0.1  | 0.2  | 0.2  | 0.1  | 0.2  |
| <b>10-14</b> | 0.9  | 1.1  | 0.9  | 0.7  | 1.2  | 1.2  | 1.2  | 0.5  |
| <b>15-19</b> | 2.6  | 2.1  | 2.5  | 0.7  | 0.6  | 1.9  | 1.3  | 1.5  |
| <b>20-24</b> | 1.8  | 2.2  | 3    | 3    | 1.5  | 2.6  | 2.8  | 1.6  |
| <b>25-29</b> | 4.8  | 4.6  | 3.8  | 4    | 4    | 3.7  | 3.6  | 3    |
| <b>30-34</b> | 6    | 6.4  | 5.4  | 5.9  | 5.3  | 6    | 4.8  | 5.6  |
| <b>35-39</b> | 12   | 10.1 | 8.4  | 11.3 | 10.9 | 10   | 6.9  | 7.8  |
| <b>40-44</b> | 18.7 | 19.5 | 16.7 | 18.3 | 18.8 | 18.2 | 15.5 | 14.9 |
| <b>45-49</b> | 26.5 | 27.1 | 27.8 | 26.4 | 25.7 | 30   | 24.8 | 24.2 |
| <b>50-54</b> | 30.7 | 29.6 | 32.5 | 29.2 | 31.4 | 31.6 | 31   | 30.5 |
| <b>55-59</b> | 36.4 | 35.5 | 35.6 | 35.1 | 37.7 | 38   | 31.6 | 35.9 |
| <b>60-64</b> | 38.2 | 39.6 | 37.4 | 35.5 | 38.6 | 39.7 | 32.4 | 35.3 |
| <b>65-69</b> | 40   | 40.1 | 38.2 | 38.7 | 41.3 | 37.6 | 37.4 | 37.7 |
| <b>70-74</b> | 32.5 | 34.3 | 29.3 | 34.4 | 35.8 | 36   | 35.9 | 31   |
| <b>75-79</b> | 30.8 | 28.4 | 30.4 | 30.4 | 27.8 | 28.6 | 22.2 | 24.3 |
| <b>80-84</b> | 19.1 | 19.9 | 17.8 | 17.8 | 27.1 | 21.5 | 17.5 | 21.9 |
| <b>85+</b>   | 9    | 6.7  | 9.3  | 6.4  | 9.3  | 6.1  | 5.3  | 5.7  |

## ДОДАТОК В

### СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

**Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:**

1. **Чижма Р.А.**, Біденко М.В., Николенко А.П., Піддубний А.М., Москаленко Р. А. Патологічна біомінералізація при пухлинах яєчників. «Вістник проблем біології і медицини» Випуск 4 (158). 2020 рік, 43-48. *(Дисертантом проведено пошук літератури, її аналіз та угальнення).*
2. **Чижма Р.А.**, Николенко А.П., Піддубний А.М., Москаленко Р.А. Аналіз захворюваності на злоякісні пухлини яєчників у Сумській області в 2014–2018 рр. Морфологія. 2021;15(1):73-8. *(Дисертантом проведено пошук статистичних даних, їх аналіз, опис результатів та узагальнення висновків).*
3. **Chyzhma R**, Piddubnyi A, Danilchenko S, Kravtsova O, Moskalenko R. Potential Role of Hydroxyapatite Nanocrystalline for Early Diagnostics of Ovarian Cancer. Diagnostics. 2021; 11(10):1741. *(Дисертантом проведено гістологічне, гістохімічне, імуногістохімічне дослідження зразків, аналіз отриманих результатів, підготовка статті до друку).*
4. Hyriavenko N, Lyndin M, Sikora V, **Chyzhma R**, Lyndina Y, Sikora K, Awuah WA, Romaniuk A. Neuroendocrine Tumor of the Fallopian Tube and Serous Adenocarcinoma of the Ovary: Multicentric Primary Tumors. Turk Patoloji Derg. 2023;39(2):161-166. doi: 10.5146/tjpath.2022.01589. *(Дисертантом проведено імуногістохімічне дослідження зразків та аналіз отриманих результатів).*
5. **Чижма Р.А.**, Москаленко Р.А.. Імуногістохімічне дослідження раку яєчників з патологічною біомінералізацією. «Одеський медичний журнал», 2023 (4). *(Дисертантом проведено імуногістохімічне дослідження зразків, аналіз отриманих результатів та формулювання висновків).*

**Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:**

6. **Chyzhma R.A.**, Soloviov N.O., Sikora V.V., Piddubnyi A.M. The role of psammoma bodies in the ovarian serous adenocarcinoma (literature review). Biomedical Perspectives II: Abstract book of International Scientific Conference of Students. Postgraduates and Young Scientists. Sumy. October 20-22. 2020. – Sumy: Sumy State University. 2020 – 15. *(Дисертантом проведено пошук літературних джерел, їх аналіз та угальнення).*
7. **R. Chyzhma**, A. Piddubnyi, A. Stepanenko, S. Danilchenko and R. Moskalenko. "Morphology of Nanocrystalline Calcifications of Ovarian Tumors." 2021 IEEE 11th International Conference Nanomaterials: Applications & Properties (NAP). 2021. pp. 1-4. *(Дисертантом проведено підготовку зразків, аналіз отриманих результатів та формулювання висновків).*
8. **Чижма Р.А.**, Піддубний А.М., Степаненко А.О., Данильченко С.М., Москаленко Р.А. Морфологія патологічних біомінералів серозних карцином яєчників. Всеукраїнська міждисциплінарна науково-практична конференція з міжнародною участю «УМСА – століття інноваційних напрямків та наукових досягнень»; 2021 жовтень 8; Полтава. Полтава: Полтавський державний медичний університет; 2021. с 186-188. *(Дисертантом проведено підготовку зразків, аналіз отриманих результатів та формулювання висновків).*
9. **Chyzhma R.**, Litvinec M., Moskalenko R. Morphometrical analysis of serous ovarian carcinoma with Psammoma Bodies. Biomedical Perspectives III: Abstract book of International Medical Conference. Sumy. October 26-28. 2021. – Sumy: Sumy State University. 2021 (3): 92. *(Дисертантом проведено морфометричне дослідження зразків, аналіз отриманих результатів та формулювання висновків).*
10. **R. Chyzhma**, R. Moskalenko. Search for "needles" of hydroxyapatite in the "haystack" of ovarian cancer. Twenty-third Annual Conference YUCOMAT 2022. *(Дисертантом проведено підготовку зразків, аналіз отриманих результатів та формулювання висновків).*

11. **R. Chyzhma**, A. Piddubnyi, A. Stepanenko, O. Pylypenko and R. Moskalenko. "The Study of the Nanocrystalline Structure of Psammoma Bodies of Serous Ovarian Carcinoma." 2022 IEEE 12th International Conference Nanomaterials: Applications & Properties (NAP). 2022. pp. NRA03-1-NRA03-4. *(Дисертантом проведено гістологічне, імуногістохімічне, морфометричне дослідження зразків, аналіз отриманих результатів та формулювання висновків).*
12. **Chyzhma R**, Moskalenko R. Expression of Osteopontin in serous ovarian carcinoma. 35th European Congress of Pathology; 09–13 September 2023 (Dublin, Ireland); Berlin, Germany: Springer. Virchows Archiv: 2023; 483 (Suppl 1):S256. *(Дисертантом проведено імуногістохімічне дослідження, аналіз отриманих даних та формулювання висновків).*
13. **Chyzhma R**, Moskalenko R. PROSPECTS FOR THE USE OF PATHOLOGICAL BIOMINERALIZATION IN THE DIAGNOSIS OF OVARIAN CANCER. The scientific paradigm in the context of technological development and social change: Scientific monograph. Part 2. Riga. Latvia: "Baltija Publishing". 2023. 464 p. ISBN: 978-9934-26-297-5. *(Дисертантом проведено гістологічне, гістохімічне, імуногістохімічне, морфометричне дослідження зразків, аналіз отриманих результатів та формулювання висновків).*
14. **R. Chyzhma** and R. Moskalenko, "Trace Elements as a Specific Marker for Ovarian Cancer Biomineralization," 2023 IEEE 13th International Conference Nanomaterials: Applications & Properties (NAP), Bratislava, Slovakia, 2023, pp. NRA08-1-NRA08-4, doi: 10.1109/NAP59739.2023.10310855. *(Дисертантом проведено імуногістохімічне дослідження зразків, аналіз отриманих результатів та формулювання висновків).*
15. **Чижма Р. А.**, Москаленко Р. А. Експресія остеобластичних маркерів в тканині раку яєчників з патологічною біомінералізацією. «Актуальні проблеми патологічної анатомії», 5-6 жовтня 2023 р., «Український

науково-медичний молодіжний журнал», №4, doi: 10.32782/2226-2008-2023-4-7.

*(Дисертантом проведено імуногістохімічне дослідження зразків, аналіз отриманих результатів та формулювання висновків).*

## ДОДАТОК Г

### АПРОБАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

1. Міжнародна науково-практична конференція «BIOMEDICAL PERSPECTIVES II» (м. Суми, Україна, 2020 р.) – тези, постерна доповідь.
2. Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «УМСА – століття інноваційних напрямків та наукових досягнень» (м. Полтава, Україна, 2021 р.) – тези, усна доповідь.
3. Міжнародна науково-практична конференція «BIOMEDICAL PERSPECTIVES III» (м. Суми, Україна, 2021 р.) – тези, постерна доповідь.
4. Міжнародна конференція NAP-2021(м. Одеса, Україна, 2021 р.) стаття, постерна доповідь.
5. Міжнародна конференція YUCOMAT 2022 (м. Герцег-Нові, Чорногорія, 2022 р.) – тези, постерна доповідь.
6. Міжнародна конференція NAP-2022 (м. Краків, Польща, 2022 р.) – тези, постерна доповідь.
7. 35-й Європейський конгрес патологів (м. Дублін, Ірландія, 2023 р.) –тези, електронний постер.
8. Міжнародна конференція NAP-2023 (м. Братислава, Словаччина, 2023 р.) – стаття, постерна доповідь.
9. Науково-практична конференція «Актуальні проблеми патологічної анатомії» (м. Київ, Україна, 5-6 жовтня 2023 р.) – тези, постерна доповідь.
10. Дисертаційну роботу заслухано на засіданні апробаційної ради Навчально-наукового медичного інституту СумДУ 24 січня 2024 року (протокол № 37).