

УДК 616.-036.82; 615.8, 616-006-097.3-07-089

УКПП

№ держреєстрації № 0121U100472

Інв. №

Міністерство освіти і науки України
Сумський державний університет (СумДУ)
40007, м. Суми, вул. Римського-Корсакова, 2
тел. (0542) 33-35-39 факс. (0542) 33-40-58
e-mail: info@sci.sumdu.edu.ua

ЗАТВЕРДЖУЮ
Проректор з наукової роботи
д-р фіз.-мат. наук, професор

_____ А.М. Черноус

ЗВІТ
ПРО НАУКОВО-ДОСЛІДНУ РОБОТУ
Розробка методу інтраопераційної діагностики злоякісних пухлин за
допомогою флюорофор-кон'югованих антитіл до молекул раково-
ембріонального антигену

IN VIVO ДОСЛІДЖЕННЯ ФЛЮОРОФОР-КОН'ЮГОВАНИХ
АНТИ-СЕАСАМ АНТИТІЛ
(остаточний)

Науковий керівник
канд.мед наук, доцент

М.С. Линдін

2023

Рукопис закінчено 22 грудня 2023 р.

Результати роботи розглянуто науковою радою СумДУ, протокол №_ від __.__. 2023 р.

СПИСОК АВТОРІВ

Керівник НДР, ст. наук. співроб., канд. мед. наук	<hr/>	М.С. Линдін (розділ 1,2,3)
	(22.12.2023)	
Відповідальний виконавець, ст. наук. співроб., канд. мед. наук	<hr/>	В.В. Сікора (розділ 1,2,3)
	(22.12.2023)	
Наук. співроб., канд. наук	<hr/>	Я.О. Кравченко (розділ 1)
	(22.12.2023)	
Ст. наук. співроб., канд. мед. наук	<hr/>	Ю.М. Линдіна (розділ 2,3)
	(22.12.2023)	
Наук. співроб., канд. мед. наук	<hr/>	Т.Б. Олешко (розділ 3)
	(22.12.2023)	
Молодший наук. співроб.	<hr/>	К.О. Сікора (розділ 1,3)
	(22.12.2023)	
Виконавець	<hr/>	Д.Г. Цепоко (розділ 1)
	(22.12.2023)	
Виконавець	<hr/>	О.М. Смородська (розділ 2)
	(22.12.2023)	
Виконавець	<hr/>	Є.А. Строй (розділ 2)
	(22.12.2023)	
Виконавець	<hr/>	Я.В. Сікора (розділ 3)
	(22.12.2023)	

Лаборант

І.К. Янко
(розділ 3)

(22.12.2023)

Лаборант

В.Г. Золотарьова
(розділ 2)

(22.12.2023)

РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 122 с., 41 рис., 209 джерел.

ІМУНОГІСТОХІМІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ, ІНТРАОПЕРАЦІЙНА ДІАГНОСТИКА, КАНЦЕРОГЕНЕЗ, МОЛЕКУЛИ КЛІТИННОЇ АДГЕЗІЇ, ФЛЮОРОФОР-КОН'ЮГОВАНІ АНТИТІЛА.

Об'єкт дослідження – злоякісні пухлини основних локалізацій.

Предмет досліджень – імунофенотип клітин злоякісних пухлин, молекулярні особливості взаємодії флюорофор-кон'югованих антитіл з клітинами карцином *in vitro* та *in vivo*, ефективність використання хірургії під контролем флюоресценції при візуалізації злоякісних новоутворень.

Мета роботи – створення методики інтраопераційної фотодинамічної візуалізації в ближній інфрачервоній області спектру злоякісних пухлин основних локалізацій за допомогою флюорофор-кон'югованих антитіл до молекул раково-ембріонального антигену.

Для досягнення поставленої мети були визначені такі завдання:

- дослідити імунологічний профіль злоякісних пухлин щодо СЕАСАМ зі встановленням їх відмінності від імунофенотипу незмінених тканин.

- створити комплексні з'єднання флюорофорів з анти-СЕАСАМ антитілами та встановити *in vitro* рівень їх селективності та стабільності.

- дослідити *in vivo* інтраопераційну діагностичну ефективність флюорофор-кон'югованих антитіл при моделюванні злоякісних пухлин у тварин.

- розробити протоколи інтраопераційної діагностики злоякісних пухлин та сформулювати рекомендації щодо їх використання у практичній медицині.

Методи дослідження – гістологічне та імунофлюоресцентне дослідження; створення флюорофор-кон'югованих анти-СЕАСАМ антитіл; *in vivo* експерименти; математичні методи. Дослідження спрямовані на встановлення імунофенотипу пухлинної тканини, визначення унікальності їх

рецепторного профілю, синтез високоселективних флюоресцентних месенджерів та тестування їх ефективності в експериментах.

ЗМІСТ

Вступ-----	7
1 Дослідження впливу імуногістохімічних особливостей злоякісних пухлин на прогресування неопластичного процесу-----	9
1.1 Імунофенотип ендометріальних карцином та його вплив на пухлинний процес-----	9
1.2 Залежність мікросудинної щільності карцином від гістологічних та імуногістохімічних особливостей пухлин-----	24
1.3 Експресія молекул клітинної адгезії у тканині ендометрію та ендометріюїдних аденокарцином-----	31
1.4 Морфологічні та імуногістохімічні особливості плоскоклітинного раку шийки матки-----	35
2 Дослідження взаємодії CEACAM1 з патогенними білками-----	43
3 Особливості флуоресцентної візуалізації злоякісних пухлин-----	62
3.1 Інтеропераційна візуалізація новоутворень комбінацією радіоактивної мітки та флуоресцентного сигналу-----	65
3.2 Клінічно доступні методи флюоресцентної візуалізації-----	68
3.3 Широкозастосовні та доступні для клінічного використання флуоресцентні візуалізаційні зонди-----	72
3.4 Нові зонди флуоресцентної візуалізації-----	81
3.5 Особливості діагностики первинного раку маткових труб під час і після операції-----	84
4 Висновки-----	96
Перелік джерел посилання-----	98

ВСТУП

Злоякісні пухлини є однією з найактуальніших проблем сьогодення. Незважаючи на стрімкий науково-технічний прогрес, і досі відсутні можливості повного контролю над ініціюванням та прогресуванням карцином, а також тотального виліковування пацієнтів. Це спонукає до пошуку новітніх діагностично-терапевтичних методик та індикаторів пухлинного розвитку з подальшим їх впровадженням у медичну практику нашої держави. Одними з таких маркерів є білки сімейства PEA – CEACAM, які нараховують більше, ніж 12 видів. Більшість з них виявлено у людини, хоча деякі з них також експресуються у тканинах тварин [1-2]. CEACAM беруть участь у функціонуванні клітин, опосередковуючи їх здатність до поділу, проліферації, адгезії, диференціювання та інше [2]. При неопластичній трансформації спостерігається зміна імунологічного фенотипу неопластичних клітин щодо експресії CEACAM [3-4], що частково використовується у повсякденній практиці при діагностиці злоякісних пухлин (визначення експресії CEACAM5 – PEA). На сьогодні існує значна кількість анти-CEACAM антитіл, які вибірково розпізнають клітинні білки та можуть впливати на їх функціональну активність [5-6]. Більше того, існують експериментальні дослідження щодо використання цих білків у якості месенджерів до патологічно-зміненої тканини.

Ефективність видалення пухлин безпосередньо залежить від якості їх перед- та інтраопераційної візуалізації. Наявність «позитивних» країв резекції та залишкових мікрометастазів обумовлює рецидивування захворювання та необхідність повторного лікування. Саме тому одним із сучасних напрямів дослідження є пошук ефективних та високочутливих діагностичних методик, які б позбавили пацієнтів від тяжких післяопераційних ускладнень. Одним з таких методів є хірургія під контролем флюоресценції (ХпКФ), яка миттєво надає інформацію про межі поширення пухлини під час операції. Цей метод передбачає мічення пухлини флюорофорами з наступною їх візуалізацією за допомогою джерела світла визначеної частоти та фіксації сигналу від

флюорофорів за допомогою системи фільтрів, лінз та камер [7-8]. Для остаточної реєстрації сигналів використовуються CCD/ICCD об'єктиви та цифрові CMOS-камери. ICCD об'єктиви та пристрої з посиленням зарядним зв'язком можуть детектувати одиничні фотони, мають систему блокування сигналу та не вимагають системи охолодження. ХпКФ показала високу ефективність у сучасній хірургічній практиці. Не зважаючи на це, і досі залишається ряд перешкод, які не дозволяють широко та ефективно використовувати ХпКФ у повсякденній практиці. З одного боку, не існує жодного універсального флюорофору, який би взаємодівав виключно з неопластичною тканиною без фонового забарвлення нормальних інтактних ділянок органа. З іншого боку, відсутні фінансово доступні прилади для ідентифікації та обробки флюоресцентних сигналів [9-10]. Останнім часом з'являється все більше даних про можливість удосконалення ХпКФ шляхом використання специфічних високоафінних молекул у якості месенжерів флюоресцентних міток, що може піднести дану методику на новий діагностичний рівень, сприяючи більш ефективному та цілеспрямованому лікуванню онкологічних хворих.

1 ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ІМУНОГІСТОХІМІЧНИХ ОСОБЛИВОСТЕЙ ЗЛОЯКІСНИХ ПУХЛИН НА ПРОГРЕСУВАННЯ НЕОПЛАСТИЧНОГО ПРОЦЕСУ

1.1 Імунофенотип ендометріальних карцином та його вплив на пухлинний процес

Рак тіла матки є одним з найпоширеніших гінекологічних злоякісних новоутворень, серед яких аденокарциноми ендометрію (АЕ) становить близько 90 %. Близько 80 % АЕ – це ендометріюїдні аденокарциноми ендометрія (ЕАЕ), які переважно є чутливими до стероїдних гормонів та є представниками 1 типу АЕ. Тип 2 АЕ включає серозні (САЕ) і світлоклітинні аденокарциноми ендометрія (СКАЕ), які не пов'язані з надлишком естрогену та в практичній діяльності зустрічаються у близько 5 та 2 % відповідно [1]. Прогноз АЕ залежить від гістологічного типу карцином, якісних характеристик неопластичних клітин та їх строми [2, 3]. Вони можуть бути єдиною злоякісною пухлиною у жінок або однієї зі складових первинно-множинних пухлин [4]. Незважаючи на доведену прогностичну цінність низки імуногістохімічних маркерів, на сьогодні існує потреба у пошуку нових індикаторів прогресування АЕ для використання їх медичній галузі. Одними із таких молекул, які можуть мати діагностично-терапевтичну ефективність, є циклооксигенази (ЦОГ) [5, 6].

Група ЦОГ включає три представники: ЦОГ1, ЦОГ2 та ЦОГ3 [7]. На сьогоднішній день особлива увага прикута до ЦОГ2 у зв'язку з-за можливості шляхом їх блокування впливати на перебіг злоякісних пухлин [8]. Цей білок, який відкрито у 1991 році [9], каталізує реакції по утворенню простаноїдів (простагландин Е2 – PGE2), які мають виражений проканцерогенний ефект [10]. У нормі базальну експресію COX2 виявлено у шлунку, нирках, нервовій системі та жіночих статевих органах [11]. Серед різних гістологічних типів карцином (плоскоклітинний рак, перехідноклітинний рак, холангіокарцинома,

гепатокарцинома) їх експресію виявлено також у АЕ [12]. Це може бути індикатором неопластичної трансформації нормальних клітин у пухлинні [13]. Надекспресія COX2 призводить до погіршення прогнозу, супроводжуючись зростанням рецидивування та метастазування пухлин, зниженням виживаності та підвищенням резистентності до хіміотерапії [8, 14]. При цьому відбувається стимуляція пухлинних клітин до росту, їх виживаності та інвазії; активується ангиогенез та зростає мікросудинна щільність (МСЩ) у неопластичній тканині [8, 15, 16].

Каталізуючи утворення PGE2 за принципом позитивного зворотного зв'язку, ЦОГ2 сприяє регуляції Bcl-2, VEGF, MMPs, EGFR [17] та підтримці ракових стовбурових клітин [18]. ЦОГ2 модулює активність M2-макрофагів [14], стимулює асоційовані з раком фібробласти [19], активує утворення активних форм кисню [20] та запалення [17], пригнічує антипухлинну імунну відповідь [21], посилює проліферативну активність пухлинних клітин [14], інгібує апоптоз [17, 22], інактивує адгезивні молекули [23], індукує епітеліально-мезенхімальну трансформацію [18]. Це призводить до неопластичної трансформації клітин та прогресування злоякісних пухлин. З іншого боку, низка ензимів є стимуляторами синтезу та активності ЦОГ2. Серед них найвагоміший вплив мають NF- κ B, PI3K, AKT, MAPK, HIF, та EGFR [8]. Пухлинне мікрооточення також може мати індукуючий вплив на надекспресію ЦОГ2 [24, 25].

Крім проонкогенних властивостей ЦОГ2, існують дані про їх туморсупресивний вплив на організм [8]. 8-гідроксіоктанова кислота, яка утворюється під впливом ЦОГ2, інгібує пухлинний ріст та міграцію клітин [20]. На ефекти ЦОГ2 впливає також їх локалізація у клітинах. Їх ядерна транслокація у комплексі з ERK призводить до апоптозу клітин [22]. Натомість цитозольна їх локалізація (мітохондріальна транслокація) стимулює проліферацію клітин [22, 26]. У деяких пухлинах (остеосаркома, гліома) надекспресія ЦОГ2 призводить до супресії проліферації та активації апоптозу клітин [27, 28].

Низьку цитоплазматичну експресію ЦОГ2 виявлено у нормальному ендометрії фази проліферації [29]. При цьому спостерігається елевація експресії ЦОГ2 при гіперплазії ендометрію [30], ендометритах [31] та ЕС [34]. У пухлинах ендометрію ЦОГ2 модулює ангиогенез, міграцію, інвазивність та імуносупресію, а також запобігання апоптозу [30, 32 – 35]. Експресія білка ЦОГ2 була пов'язана зі стадіями FIGO та диференціацією раку ендометрія [34, 36, 37]. Пацієнти з гіперекспресією ЦОГ2 частіше мали поганий прогноз [34, 37]. Позитивність ЦОГ2 спостерігалася переважно при аденокарциномах типу II, ніж при аденокарциномах I-го типу [36]. Пухлини з позитивними лімфатичними вузлами частіше показували позитивну експресію ЦОГ2, ніж пухлини з негативними вузлами. Випадки АЕ з високою інвазією міометрію також частіше мали позитивну експресію ЦОГ2 [36, 37]. Експресія ER позитивно корелювала з експресією COX2 як на рівні мРНК, так і на рівні білка [38]. Слід зазначити, що експресія ЦОГ2 не обмежується нормальними ендометріальними та раковими клітинами. Було виявлено наявність цих білків також у запальних клітинах строми ендометрію та їх мікрооточення [31, 38].

Окремі дослідження демонструють значно нижчу експресію ЦОГ2 у АЕ, порівняно з незлоякісними ураженнями, відсутність кореляції між експресією ЦОГ2 та глибиною інвазії, ступенем гістологічного ступеня та 5-річною виживаністю без прогресування та загальною виживаністю жінок [39].

Пригнічення активності ЦОГ2 виглядає обнадійливою стратегією у лікуванні злоякісних пухлин, враховуючи існування низки селективних та неселективних блокаторів цих ензимів [8]. Вона показала свій позитивний ефект у низки карцином, які як мали надекспресію цих білків [40], так навіть і при пухлинах з відсутньою експресією ЦОГ2 [41]. При цьому обов'язково слід враховувати тип карциноми, тип та дозу інгібіторів ЦОГ2, ступінь злоякісності та можливість і ефективність їх комбінування з іншими хіміопрепаратами [8].

У цій статті ми вперше показуємо залежність експресії ЦОГ2 від гістологічних особливостей АЕ, вплив ЦОГ2 на експресію прогностично-важливих білків у тканинах ЕАЕ, САЕ та СКАЕ. Нами доведено, що

варіабельність експресії ЦОГ2 проявляється на якісних характеристиках неопластичних клітин та пухлинного мікрооточення. Зростання вмісту ЦОГ2 у клітинах АЕ призводить до прогресування та набуття ними більш агресивних властивостей.

Ми використовували післяопераційний матеріал жінок, які перебували на лікуванні в Сумському обласному онкологічному диспансері (відділення гінекології). Ми вивчили 50 випадків АЕ: 30 випадків ЕАЕ, 10 випадків САЕ і 10 випадків СКАЕ. Усі пухлини були класифіковані відповідно до рекомендацій Всесвітньої організації охорони здоров'я. Нормальні тканини ендометрія (n=10) були отримані від жінок, які страждали на лейоміому матки (доброякісні пухлини). Пацієнти надали письмову інформовану згоду на дослідження тканин. Комісія з біоетики Медичного інституту Сумського державного університету затвердила протокол експерименту (№ 11/2 від 10.05.2021).

Для гістологічного дослідження ми приготували зрізи товщиною 5 мкм із залитих у парафінові блоки тканини, нанесли їх на мікроскопічні предметні скельця SuperFrost («Thermo Scientific») і піддали предметні скельця стандартній депарафінізації у двох порціях ксилолу та регідратації у знижуваній концентрації етанолу. Після цього їх фарбували гематоксином та еозином за стандартною методикою.

Імуногістохімічне дослідження та візуалізацію білків проводили згідно з рекомендаціями виробника системи детекції. Основні етапи цієї методики детально описані в нашій попередній публікації [42]. В імуногістохімічному дослідженні використовували кролячі поліклональні антитіла до ЦОГ2 («Diagnostic BioSystems»); кролячі моноклональні антитіла до ER (клон SP1), PR (клон YR85), Ki-67 (клон SP6) і EGFR (клон EP38Y) («Thermo Scientific»); мишачі моноклональні антитіла до p53 (клон SP5) та bcl-2 (клон 100/D5) («Thermo Scientific»); кролячі поліклональні антитіла до VEGF і MMP1 («Thermo Scientific»); мишачі моноклональні антитіла до CD31 (клон 1A10)

(«Біо-Рад»); кролячі моноклональні антитіла до CD163 (клон EP324) («Master Diagnostica»).

Три патологоанатоми незалежно проаналізували результати гістологічного та імуногістохімічного забарвлення. Щоб визначити структуру експресії Bcl-2, EGFR, MMP1 та VEGF, ми використали спрощену трирівневу систему оцінки: «-» для негативної експресії, «+» для низької експресії, «++» для помірної експресії та «+++» для сильної експресії (0 – 5%, 5 – 25%, 26 – 50% і > 50% позитивних клітин відповідно). Патерн експресії p53 реєстрували як позитивне або негативне фарбування. Для експресії ER, PR і Ki-67 ми реєстрували відсоток рецептор-позитивних клітин серед загальної кількості пухлинних клітин. МСЩ і кількість CD163-позитивних клітин (M2-макрофагів) визначали в трьох полях зору при збільшенні $\times 200$.

Для оцінки експресії ЦОГ2 використовували комбіновану оцінку, засновану на відсотку забарвлених клітин та інтенсивності фарбування. За відсотком імуногістохімічно позитивних клітин зрізи оцінювали наступним чином: 0 — негативний; 1, 1–25% позитивних клітин; 2, 26–50% позитивних клітин; і 3 > 50 % позитивних клітин. Інтенсивність імунофарбування оцінювали наступним чином: 0, негативна; 1 — слабопозитивна; 2 — помірно позитивна; і 3, інтенсивно позитивна. Обидва набори балів були додані для отримання загальної кількості балів таким чином: 0 балів (-); 1 – 2 бали (+); 3 – 4 бали (++); та 5 – 6 балів (+++) [34].

Усі дослідження проводили на мікроскопі Carl Zeiss Primo Star з цифровою камерою Zeiss AxioCam ERc 5s та пакетом програм ZEN 2 (blue edition, Німеччина).

Обробку даних проводили за допомогою пакету статистичних програм GraphPad Prism® версії 6.0. Ми розрахували середнє арифметичне (M) і стандартне відхилення (SD). Оцінку відмінностей між порівнюваними показниками проводили за допомогою Манна-Уїтні (u). Значущість відмінностей між трьома групами визначали за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) з апостеріорним тестом Бонферроні.

Виявлення та оцінка кореляційних зв'язків між показниками здійснювалась за непараметричним коефіцієнтом кореляції Спірмена (r). Р-значення 0,05 (95% достовірність) вважалося статистично значущим.

Середній вік хворих на АЕ становив $59,8 \pm 8,7$ років. За класифікацією FIGO серед 50 досліджених випадків 16 відповідали I стадії, 18 — II, 16 — III стадії. Пацієнти з ЕАЕ мали середній вік $56,2 \pm 8,4$ років, з САЕ – $63,6 \pm 5,4$ років, та з СКАЕ – $66,7 \pm 6,7$ років. Встановлено, що жінки з типом II АЕ були старшими за жінок з типом I АЕ ($p = 0,0006$). При цьому різниці щодо стадії FIGO між ними не виявлено ($p > 0,05$). Не виявлено також різниці між випадками АЕ щодо наявності метастазів у регіонарних лімфатичних вузлах ($p > 0,05$). Їх наявність зафіксована у 37 % ЕАЕ, 20 % САЕ, та 30 % СКАЕ (рис. 1.1). Середній вік жінок, у яких досліджували експресію ЦОГ2 у нормальному ендометрії, становив $40,4 \pm 4,9$ років.

			***	***	***	***	**	***	***	***	***	***	***	***	***
	n	FIGO	Age	VEGF	ER, %	PR, %	Ki-67, %	p53	MVD	Mts	Bcl-2	MMP1	EGFR	CD163	COX2
EC	50	I – 16	59.8	0 – 0	33.1	25.8	47.4	25/50	16.8	16/50	0 – 13	0 – 32	0 – 19	25.96	0 – 0
		II – 18	±	1+ – 10	±	±	±		±		1+ – 17	1+ – 13	1+ – 20	±	1+ – 8
		III – 16	8.7	2+ – 19	27.5	22.7	14.1		7.1		2+ – 11	2+ – 5	2+ – 9	±	2+ – 22
				3+ – 21						3+ – 9	3+ – 0	3+ – 2	8.4	3+ – 20	
EEC	30	I – 8	56.2	0 – 0	53.8	42.4	45.8	5/30	19.2	11/30	0 – 0	0 – 17	0 – 6	22.2	0 – 0
		II – 11	±	1+ – 7	±	±	±		±		1+ – 10	1+ – 8	1+ – 13	±	1+ – 8
		III – 11	8.4	2+ – 11	12.7	12.2	16.1		7.5		2+ – 11	2+ – 5	2+ – 9	±	2+ – 11
				3+ – 12						3+ – 9	3+ – 0	3+ – 2	4.7	3+ – 11	
SEC	10	I – 4	63.6	0 – 0	4.0	1.5	44.5	10/10	11.2	2/10	0 – 6	0 – 7	0 – 6	37.7	0 – 0
		II – 4	±	1+ – 1	±	±	±		±		1+ – 4	1+ – 3	1+ – 4	±	1+ – 0
		III – 2	5.4	2+ – 3	5.1	2.1	8.9		3.6		2+ – 0	2+ – 0	2+ – 0	±	2+ – 4
				3+ – 6						3+ – 0	3+ – 0	3+ – 0	7.9	3+ – 6	
CCEC	10	I – 4	66.7	0 – 0	0	0	54.9	10/10	15.2	3/10	0 – 7	0 – 8	0 – 7	24.7	0 – 0
		II – 3	±	1+ – 2	±	±	±		±		1+ – 3	1+ – 2	1+ – 3	±	1+ – 0
		III – 3	6.7	2+ – 5	±	±	9.5		4.9		2+ – 0	2+ – 0	2+ – 0	±	2+ – 7
				3+ – 3						3+ – 0	3+ – 0	3+ – 0	7.2	3+ – 3	

Рисунок 1.1 – Характеристики груп пацієнтів. EC – всі випадки ендометріальних карцином; EEC – випадки з ендометріюїдними ендометріальними карциномами; SEC – випадки з серозними ендометріальними карциномами; CCEC – випадки зі світлоклітинними ендометріальними карциномами. Достовірна різниця між групами пацієнтів за даними ANOVA * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

Тканіна ЕАЕ демонструвала залозисту архітектуру, вистелену багатошаровим стовпчастим епітелієм зі скупченою, складною, розгалуженою архітектурою [43]. Пухлинні клітини щільно прилягають одна до однієї, утворюючи плавні контури залозистих просвітів. Вони переважно мають еозинофільну цитоплазму, різний ступінь ядерного атипізму та високий мітотичний індекс. У залежності від площі, зайнятої солідним ростом, АЕА поділялися на 1 ступінь (пухлини, що складаються з менш ніж 5% солідного росту) (рис. 1.2), ступінь 2 (пухлини, що мають площу, що складає 6 – 50% солідного росту) та ступінь 3 (пухлини мають більш ніж 50% солідного росту) (рис. 1.3). Слід зазначити, що при ядерній атипії 3 пухлинний клас збільшився на одну позицію. Серед 30 років АЕА сім зразків відповідали 1 ступеню, 16 – 2 ступеню, та 7 – 3 ступеню.

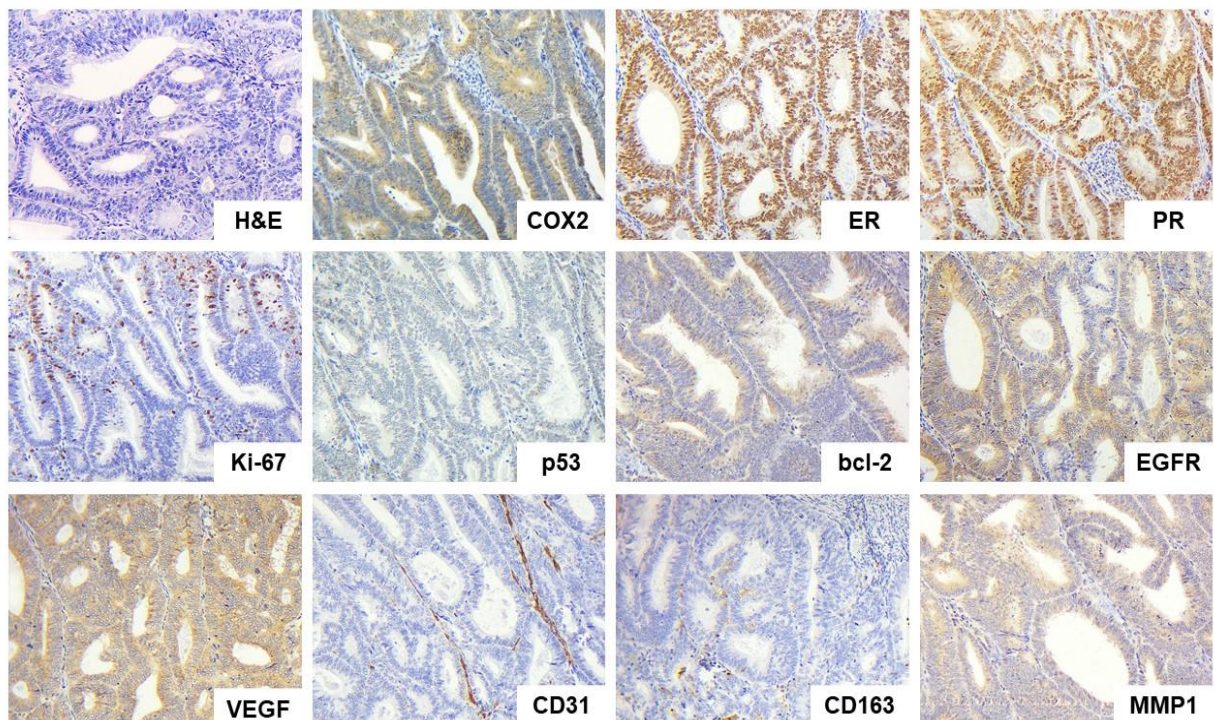


Рисунок 1.2 – Ендо метріодна карцинома ендометрію, ступінь 1. Фарбування гематоксиліном та еозином (H&E). Тканини ЕАЕ з експресією ЦОГ2, ER, PR, Ki-67, p53, bcl-2, EGFR, VEGF, CD31, CD163 і MMP1, виявлені за допомогою імуногістохімії. Збільшення x200.

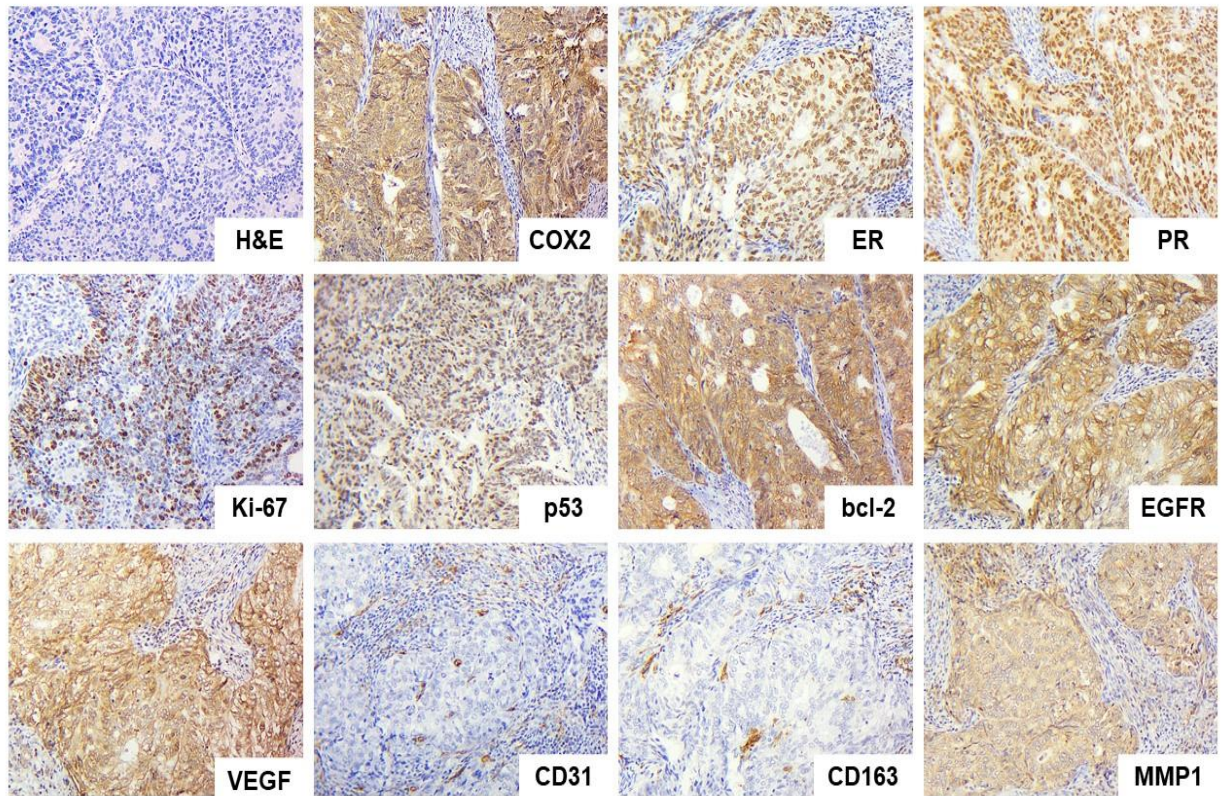


Рисунок 1.3 – Ендометріодна карцинома ендометрію, ступінь 3. Фарбування гематоксиліном та еозином (H&E). Тканини ЕАЕ з експресією ЦОГ2, ER, PR, Ki-67, p53, bcl-2, EGFR, VEGF, CD31, CD163 і MMP1, виявлені за допомогою імуногістохімії. Збільшення x200.

Тканина САЕ характеризувалася наявністю складної папілярної архітектури з ділянками солідних та гландулярних патернів. Фіброваскулярні папіли вислані епітелієм з великими атиповими ядрами, мізерною цитоплазмою та численними мітотичними фігурами [43]. Просвітні поверхні зяючих залоз і сосочків виглядають фестончастими та потертими. У просвітах наявні відокремлені клітини (рис. 1.4).

Тканина СКАЕ характеризувалася наявністю тубулярної, папілярної або солідної архітектоніки, які формувалися з свілих клітин зі світлою або еозинофільною цитоплазмою [43]. Пухлинні клітини вміщували ядра з вираженою атипією та численними мітозами (рис. 1.5).

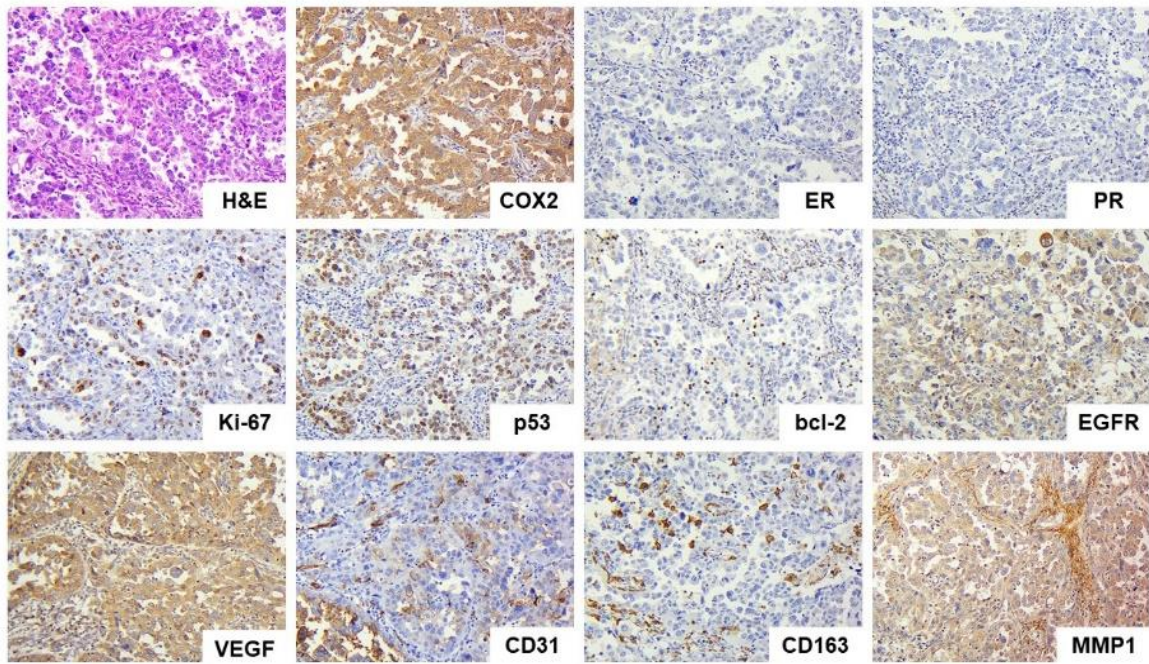


Рисунок 1.4 – Серозна карцинома ендометрію. Фарбування гематоксиліном та еозином (H&E). Тканини ЕАЕ з експресією ЦОГ2, ER, PR, Ki-67, p53, bcl-2, EGFR, VEGF, CD31, CD163 і MMP1, виявлені за допомогою імуногістохімії. Збільшення x200.

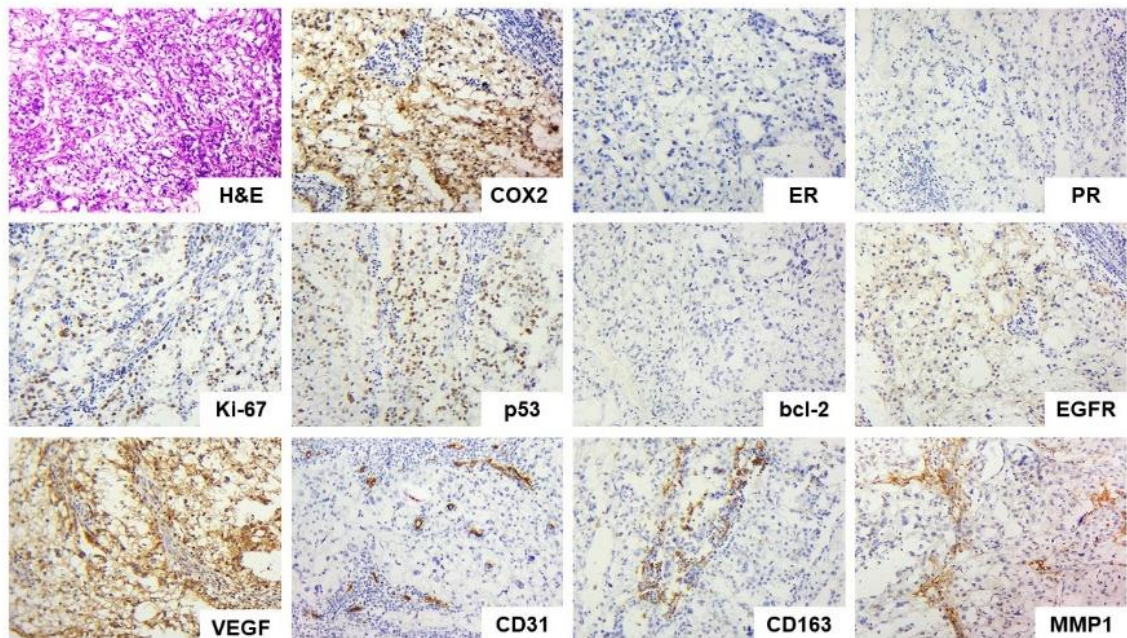


Рисунок 1.5 – Світло-клітинна карцинома ендометрію. Фарбування гематоксиліном та еозином (H&E). Тканини ЕАЕ з експресією ЦОГ2, ER, PR, Ki-67, p53, bcl-2, EGFR, VEGF, CD31, CD163 і MMP1, виявлені за допомогою імуногістохімії. Збільшення x200.

Неопластична тканина of АЕ мала різний ступінь МСЦ, яка залежала від гістологічного варіанту карцином ($p = 0.0043$) та ступеня їх диференціювання ($p = 0.0055$) (рис. 1.1-1.5). У середньому МСЦ була 16.8 ± 7.1 . У тканині ЕАЕ МСЦ становила 19.2 ± 7.5 ; у САЕ – 11.2 ± 3.6 ; у СКАЕ – 15.2 ± 4.9 .

У всіх зразках пухлинного мікрооточення виявлено наявність М2-макрофагів (CD163-позитивні клітини), середня кількість яких склала 25.96 ± 8.4 клітин в одному полі зору. Їх кількість була значно вищою ($p < 0.0001$) у тканині САЕ (37.7 ± 7.9) порівняно з ЕАЕ (22.2 ± 4.7) та СКАЕ (24.7 ± 7.2).

Результати імуногістохімічного дослідження пухлинних клітин

При імуногістохімічному дослідженні (рис. 1.1-1.5) серед зразків АЕ експресію ER та PR виявлено у 33.1 ± 27.5 % та 25.8 ± 22.7 % пухлинних клітин відповідно. Вона була більше притаманна ЕАЕ ($p < 0.0001$); виявлена вогнищево у шести зразках САЕ; всі зразки СКАЕ не мали експресії цих білків. Проліферативний індекс АЕ у середньому склав 47.4 ± 14.1 та не мав статистично достовірної різниці між ЕАЕ (45.8 ± 16.1 %), САЕ (44.5 ± 8.9 %), та СКАЕ (54.9 ± 9.5 %). У половині випадків виявлено експресію p53, яка була більше притаманна зразкам САЕ та СКАЕ ($p < 0.0001$). У тканині ЕАЕ варіабельну вогнищеву експресію p53 виявлено лише у 17 % пухлин. При цьому слід зазначити, що статистично вищі показники експресії ER та PR були характерні для low-grade АЕ (ЕАЕ grade 1-2). У той час як high-grade АЕ (ЕАЕ grade 3, САЕ, and СКАЕ) мали вищий проліферативний індекс та частіше експресували p53 ($p < 0.05$).

У всіх зразках АЕ ми виявили різного ступеню вираженості цитоплазматичну експресію VEGF (рис. 1.1-1.5), яка у 20 % випадків вираженою. Різниці між гістологічними варіантами АЕ щодо експресії VEGF ми не встановили ($p > 0.05$). Натомість ми виявили статистично достовірну різницю у експресії Vcl-2 та EGFR між різними гістологічними варіантами АЕ, яка була більш виразною у типу I карцином ($p < 0.0001$ та $p = 0,0007$). Низька вогнищева експресія Vcl-2 та EGFR була лише у 35 % випадків типу II АЕ

(САЕ та СКАЕ). Експресія MMP1 мала виключно вогнищевий характер у 36 % зразків АЕ та не залежала від їх гістологічного варіанту ($p > 0.05$). При цьому ми встановили, що менш диференційовані ЕАЕ мали вищу експресію VEGF ($p = 0,02$). У той же час ступінь диференціювання ЕАЕ не впливав на особливості експресії Vcl-2, EGFR, та MMP1 ($p > 0.05$). Поділяючи всі випадки АЕ на дві групи (low-grade та high-grade АЕ), ми встановили, що більш агресивні пухлини мали менш виражену експресію Vcl-2 ($p = 0,001$) та EGFR ($p = 0,046$), що може бути пов'язано з впливом гістологічної гетерогенності high-grade АЕ.

При імуногістохімічному дослідженні встановлено, що всі випадки нормальної та пухлинної тканини ендометрію є ЦОГ2-позитивними. Незалежно від фази менструального циклу виявлена вогнищева експресія ЦОГ2 в просвітних і залозистих епітеліальних клітинах нормального ендометрію. Слабо позитивна експресія була виявлена переважно у апікальній ділянці цитоплазми призматичного епітелію (рис. 1.6). При цьому у стромі ендометрію також виявляються ЦОГ2-позитивні лімфоцити.

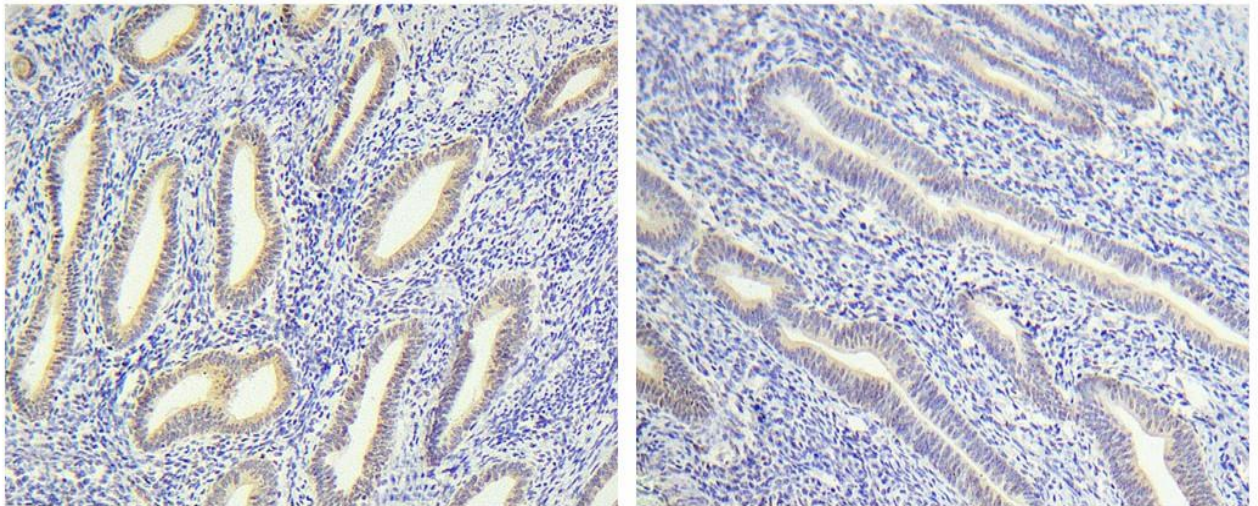


Рисунок 1.6 – Нормальний ендометрій з експресією ЦОГ2, виявлений за допомогою імуногістохімії. Збільшення x200.

Тканина АЕ мала варіабельну мембрано-цитоплазматичну експресію ЦОГ2 (рис. 1-5), яка статистично не відрізнялася між її гістологічними

варіантами ($p = 0,15$). При цьому слід зазначити, що high-grade АЕ мали виключно помірну та виражену експресію, яка статистично відрізнялася від low-grade АЕ, які мали всі типи експресії (слабка, помірна та виражена) цих білків ($p = 0,0054$). У grade 1 ЕАЕ експресія ЦОГ2 переважно локалізувалась у апікальній ділянці цитоплазми (рис. 1.2). У тканині ЕАЕ із солідним ростом та при grade 3 ядерної атипії, а також у пухлинних клітинах САЕ та СКАЕ наявність ЦОГ2 виявлено по всьому периметру цитоплазми та мембрани (рис. 1.3-1.5). У пухлинному мікрооточенні було присутні пухлино-інфільтруючі лімфоцити, які також експресували ЦОГ2.

Статистичний аналіз отриманих результатів показав, що експресія ЦОГ2 у тканині АЕ була виявлена у більш старших жінок ($p = 0,022$) та не залежала від FIGO стадії пухлин ($p = 0,14$). Аналіз гістологічних та імуногістохімічних особливостей всіх випадків АЕ показав, що надекспресія ЦОГ2 супроводжується більш вираженою експресією VEGF ($p < 0.0001$), ER ($p = 0.028$), PR ($p = 0.0014$), Ki-67 ($p < 0.0001$), та p53 ($p = 0.01$). При цьому спостерігається зростання МСЦ тканин ($p = 0.0031$) та інфільтрація її М2-макрофагами ($p < 0.0001$). Впливу ЦОГ2 у тканині АЕ на експресію Bcl-2, MMP1, EGFR, а також метастатичне поширення пухлин ми не встановили ($p > 0.05$).

При співставленні даних експресії ЦОГ2 з клініко-морфологічними та імуногістохімічними показниками окремих гістологічних варіантів АЕ ми виявили наступне (рис. 1.7): незалежно від гістотипу карцином надекспресія ЦОГ2 супроводжується більшою проліферативною активністю клітин, МСЦ тканин та інфільтрацією М2-макрофагами.

Разом з тим інтенсивність експресії ЦОГ2 у трьох гістологічних типах АЕ не залежала від віку хворих, FIGO стадії, та не впливала на експресію ER, EGFR, та MMP1. На відміну від типу II АЕ, у тканині ЕАЕ виявлено також статистично значимий вплив ЦОГ2 на експресію VEGF, p53, PR, та Bcl-2. Менш диференційовані випадки ЕАЕ вали вищу експресію ЦОГ2, яка не мала впливу на метастатичне поширення ЕАЕ.

		FIGO	Bik	VEGF	ER	PR	Ki-67	p53	МСЦ	Bcl-2	MMP1	EGFR	CD163
ЦОГ2	АЕ	0.14	0.022	<0.0001	0.028	0.0014	<0.0001	0.01	0.003	0.16	0.98	0.89	<0.0001
	ЕАЕ	0.27	0.25	<0.0001	0.76	0.045	0.0005	0.033	0.0006	0.0055	0.92	0.35	0.022
	САЕ	0.61	0.19	0.088	0.13	0.09	0.05	–	0.014	0.53	0.35	0.71	0.019
	СКАЕ	0.2	0.11	0.14	–	–	0.04	–	0.017	0.98	0.62	0.98	0.022

Рисунок 1.7 – *P*-показник залежності клініко-морфологічних та імуногістохімічних особливостей АЕ та її гістологічних варіантів від рівня експресії ЦОГ2 у пухлинних клітинах. *p*-показник 0.05 та менше вважався статистично достовірним.

АЕ, будучи найбільш частими злоякісними пухлинами тіла матки, навіть у сучасних умовах часто призводять до смерті [1, 44]. Їх прогноз залежить від гістологічного варіанту карцином, FIGO стадії, а також гістологічних і імуногістохімічних характеристик пухлинної тканини [43]. Слід зазначити, що дослідження експресії рецепторів у паренхіматозному та стромальному компонентах of АЕ, як і у пухлинах інших локалізацій, є не тільки прогностичним критерієм, але і індикатором чутливості до низки селективних препаратів [45, 46]. Основними вимогами до них є доступність, діагностична специфічність та ефективність, а також практичність у використанні у рутинній практиці. Всім цим критеріям відповідають ЦОГ2, які можуть впливати на перебіг злоякісних пухлин та використані у терапевтичних цілях [8, 14 – 25].

Досліджуючи експресію ЦОГ2 у нормальному ендометрії та тканині ЕС, ми встановили, що вона змінюється при неопластичній трансформації та впливає на прогноз. Аналогічно попереднім дослідженням [29], слабкопозитивна вогнищева експресія ЦОГ2 була виявлена у нормальному ендометрії незалежно від фази менструального циклу. Вона локалізувалася переважно у апікальній ділянці цитоплазми клітин. У тканині АЕ ми виявили посилення експресії ЦОГ2. При цьому у 16 % випадків була наявна слабо

позитивна експресія. Ми також довели, що АЕ типу ІІ мають більш виражену експресію цих білків [36]. Її апікальну цитоплазматичну локалізацію виявлено лише у grade 1 ЕАЕ. Для всіх інших типів ЕС була характерною експресія ЦОГ2 по всьому периметру цитоплазми та мембрани. З одного боку, це вказує на діагностичну цінність визначення ЦОГ2 у тканині ендометрію (помірна і сильна дифузна експресія виключно у пухлинних клітинах). З іншого боку, це унеможлиблює використання наявності експресії ЦОГ2 як запропонованого раніше індикатора пухлинних клітин з-за можливої їх експресії у нормальному ендометрії [13]. Необхідно також враховувати можливість експресії ЦОГ2 у окремих лейкоцитах нормального на пухлинного ендометрію [31, 38].

На противагу попереднім дослідженням ми не виявили залежності між FIGO стадією пухлин та експресією ЦОГ2 [34, 36, 37]. При цьому нами підтверджено факт впливу ступеню диференціювання ЕАЕ на рівень експресії цих білків [34, 36, 37]. Аналіз експресії всіх досліджуваних білків показав, що зростання кількості ЦОГ2 у пухлинних клітинах АЕ призводить до посилення експресії VEGF та MVD, про що повідомлялося раніше [8, 15 – 17]. При цьому нами не виявлено прямого впливу ЦОГ2 на метастазування карцином тіла матки, яке може бути реалізоване через посилений ангиогенез.

Всупереч попереднім дослідженням [17, 38], ми не виявили залежності між ЦОГ2 та ER, EGFR, та MMP1. При цьому ми довели їх модулюючий вплив на проліферативну активність клітин [21], який може реалізовуватись за рахунок інгібування апоптозу при утворенні мутантного білка p53 та надпродукції антиапоптозного білка Bcl-2 при надекспресії ЦОГ2 [17, 22]. Також ми довели, що надекспресія ЦОГ2 впливає на якісний склад пухлинного мікрооточення шляхом збільшення кількості протуморогенних M2-макрофагів [14]. Нами також вперше встановлено вплив ЦОГ2 на експресію PR у тканині АЕ.

Необхідно зазначити, що на результати статистичного аналізу вагомий вплив мало включення в групу досліджень АЕ різних її гістологічних типів. Це призвело до отримання хибно-позитивних даних про вікову залежність

експресії ЦОГ2 у тканинах пухлини та її вплив на експресію ER. При цьому у загальній групі карцином не виявлено впливу ЦОГ2 на Bcl-2, яка була доведена у тканинах ЕАЕ. Це може бути також однією з причин у отриманні нами дещо відмінних результатів від попередніх досліджень, які не акцентували увагу на гетерогенності АЕ.

Узагальнюючи вищевказане, ми можемо стверджувати, що експресія ЦОГ2 залежить від гістологічних особливостей АЕ та впливає на експресію прогностично-важливих білків у тканинах ЕАЕ, САЕ, та СКАЕ. Варіабельність експресії ЦОГ2 відображається на якісних характеристиках неопластичних клітин та пухлинного мікрооточення (рис. 1.8).

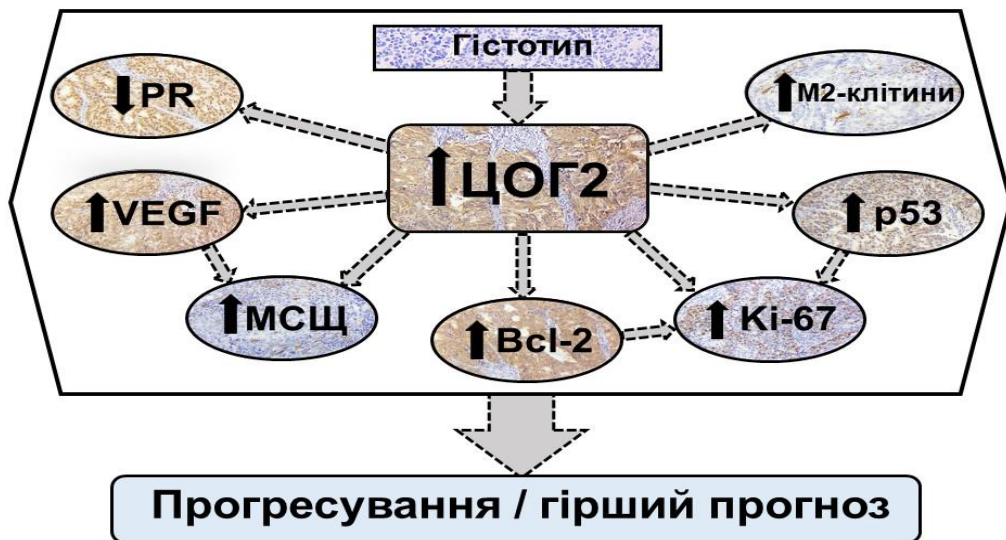


Рисунок 1.8 – Схема впливу зростання ЦОГ2 на фенотип АЕ: При дедиференціюванні ЕАЕ та у САЕ/СКАЕ спостерігається надекспресія ЦОГ2. Це призводить до пригнічення експресії PR, посилення експресії VEGF, Bcl-2, p53, зростання проліферативної активності клітин, МСЦ та інфільтрації М2-макрофагами. Все вищезазначене призводить до прогресування АЕ та погіршення прогнозу.

Зростання кількості ЦОГ2 у клітинах АЕ призводить до гіршого прогнозу. Наявність низки селективних блокаторів ЦОГ2 та попередні дані

про їх ефективність при деяких карциномах [8, 40, 41] виглядає ефективним доповненням у лікуванні АЕ.

1.2 Залежність мікросудинної щільності карцином від гістологічних та імуногістохімічних особливостей пухлин

На перебіг злоякісних пухлин можуть впливати не тільки якісні характеристики неопластичних клітин, але й їх строми. Протягом останніх десятиріччів все більше уваги приділяється неоваскуляризації тканини ЕА та її впливу на прогресування пухлин. Об'єктивним показником цього процесу є рівень мікросудинної щільності (МСЩ), який у ЕА значно перевищує показники непухлинної тканини. Виявлено вплив МСЩ на загальну виживаність, наявність лімфоваскулярної інвазії, інвазії міометрію та метастазування пухлин. Вищі показники МСЩ спостерігалися у менш диференційованих ЕА (ступінь 2 та 3). Експресія рецепторів пухлинними клітинами також відображалася на неоваскуляризації тканини ЕА: спостерігається зростання МСЩ при надекспресії фактору росту ендотелію судин (VEGF), індукований гіпоксією фактор 1α і транспортер глюкози-1; а також у ЕР та ПР негативні пухлини. При карциносаркомах ендометрію епітеліальний компонент має вищу МСЩ ніж стромальний.

Метою нашого дослідження стало встановлення залежності МСЩ у тканині ЕА від гістологічних особливостей пухлинної тканини, експресіями пухлинними клітинами ЕР, ПР, Ki-67, p53, Е-кадгерину та VEGF, а також її вплив на метастатичний потенціал карцином. З одного боку, прогресування карцином органів репродуктивної системи (їх дедиференціювання та метастатичне поширення) супроводжуються пригніченням експресії ЕР, ПР та Е-кадгерину. З іншого боку, зростання grade призводить до посилення експресії Ki-67, p53 та VEGF у цих пухлинах. Дані ж про комбінований їх вплив на МСЩ ЕА є лімітованими.

Всі хворі перебували на лікуванні в Сумському обласному онкологічному центрі (відділення гінекології). Досліджено 30 випадків ЕА ендометрію. Усі пухлини були класифіковані відповідно до рекомендацій Всесвітньої організації охорони здоров'я. Від пацієнтів були отримані письмові інформовані згоди на дослідження тканин. Комісія з біоетики Медичного інституту Сумського державного університету затвердила протокол експерименту (№ 14 від 11.03.2020).

При імуногістохімічному дослідженні ми використовували кролячі моноклональні антитіла до EP (клон SP1), PP (клон YR85), Ki-67 (клон SP6) та E-кадгерину (клон 67A4) ("Thermo Scientific"); мишачі моноклональні антитіла до p53 (клон SP5) ("Thermo Scientific"); кролячі поліклональні антитіла до VEGF ("Thermo Scientific"); мишачі моноклональні антитіла до CD31 (клон 1A10) ("Bio-Rad").

Оцінка гістологічних та імуногістохімічних препаратів здійснювалася незалежними проаналізовани трьома патологами. Для визначення патерну експресії E-кадгерину та VEGF ми використовували спрощену 3-рівневу Середній вік хворих з ЕА склав 56.2 ± 8.4 років. Згідно класифікації по FIGO серед 30 досліджуваних випадків 8 відповідали стадії 1, 11 – стадіям 2 та 3 (рис. 1.9). Ми виявили достовірну різницю між групами лише щодо експресії пухлинними клітинами PP – менший відсоток рецептор-позитивних клітин у більш поширених пухлинах ($F=4.2$, $p=0.026$) та МСЦ карцином – вищу МСЦ у більш поширених пухлинах ($F=10.33$, $p=0.0005$).

При дослідженні гістологічних зразків ми встановили, що 7 з них відповідали ступеню 1, 16 – ступеню 2 та 7 – ступеню 3. Рівень диференціювання ЕА залежав від площі пухлини із солідними патернами та ступеню ядерної атипії: G1 – менше 5% солідних полів та незначна атипія ядер, G1 – солідні поля займали від 6 до 50% з помірною ядерною атипією та G1 – більше 50% площі зайнято солідними полями пухлин, спостерігається виражена ядерна атипія (рис. 1.10).

G	n	FIGO	Середній вік	***Е кадгерин	*VEGF	**EP, %	***ПР, %	***Ki-67	**p53	**МСЦ	Мтс
1	7	1 - 4/7 2 - 2/7 3 - 1/7	57.3	1 - 0/7 2 - 0/7 3 - 7/7	1 - 4/7 2 - 2/7 3 - 1/7	65.6	51.0	25.9	0/7	14.6	1/7
2	16	1 - 3/16 2 - 7/16 3 - 6/16	56.2	1 - 0/16 2 - 8/16 3 - 8/16	1 - 3/16 2 - 7/16 3 - 6/16	53.3	44.6	45.7	1/16	18.1	6/16
3	7	1 - 1/7 2 - 2/7 3 - 4/7	55.0	1 - 2/7 2 - 5/7 3 - 0/7	1 - 0/7 2 - 2/7 3 - 5/7	43.4	29.0	66.1	4/7	26.3	4/7

Рисунок 1.9 – Характеристика груп пацієнтів за стадією по FIGO. Наявність достовірної різниці між групами пацієнтів згідно ANOVA

* – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$; *** – $p < 0.001$

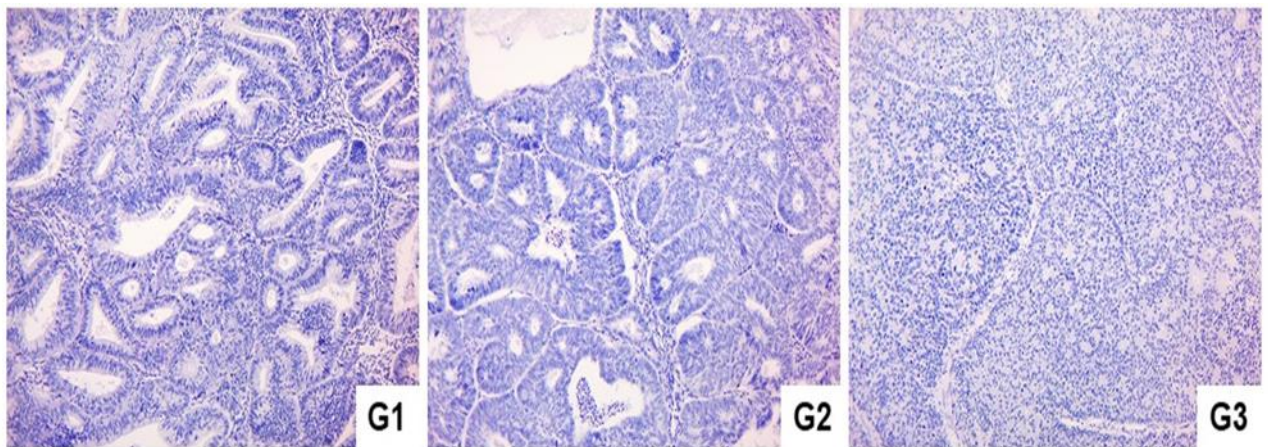


Рисунок 1.10 – Зразки ЕА різного гістологічного ступеню. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення x100.

У той же час ми знайшли відмінності між різними гістологічними ступенями ЕА (рис. 1.11).

FIGO	n	G	Середній вік	Е- кадгерин	VEGF	EP, %	*ПР, %	Ki-67, %	p53	***МСЦ	Мтс
I	8	1 - 4/8 2 - 3/8 3 - 1/8	54.1	1 - 1/8 2 - 2/8 3 - 5/8	1 - 3/8 2 - 3/8 3 - 2/8	57.6	49.1	41.9	1/8	14.9	0/8
II	11	1 - 2/11 2 - 7/11 3 - 2/11	59.1	1 - 0/11 2 - 7/11 3 - 4/11	1 - 3/11 2 - 2/11 3 - 6/11	53.4	44.9	42.6	3/11	16.0	0/11
III	11	1 - 1/11 2 - 6/11 3 - 4/11	54.8	1 - 1/11 2 - 4/11 3 - 6/11	1 - 1/11 2 - 6/11 3 - 4/11	50.5	36.0	51.9	1/11	25.5	11/11

Рисунок 1.11 – Характеристика груп пацієнтів за ступенем пухлини.

Наявність достовірної різниці між групами пацієнтів згідно ANOVA.

* – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$; *** – $p < 0.001$

Пухлини високого ступеню злоякісності (2 і 3) мали знижену експресію Е-кадгерину ($F=14.8$, $p<0.0001$), ER ($F=7.96$, $p=0.0019$), та ПР ($F=10.25$, $p=0.0005$). При цьому дедиференціювання карцином супроводжувалося посиленням експресії VEGF ($F=4.56$, $p=0.02$), Ki-67 ($F=41.9$, $p<0.0001$) та МСЩ ($F=6.34$, $p=0.0055$). Пухлини високого ступеню злоякісності частіше експресували p53 ($F=7.71$, $p=0.0022$).

При імуногістохімічному дослідженні встановлено, що експресія Е-кадгерину у 6.7% випадків тканини ЕА була слабкою, у 43.3% – помірною та у 50.0% – сильною. Слабка експресія VEGF спостерігалась у 23.3%, помірна – у 36.7% та сильна – у 40.0%. Тканина ЕА мала дифузну гранулярну локалізацію VEGF у цитоплазмі пухлинних клітин зі збереженням тенденції до перинуклеарної апікальної локалізації у високо-диференційованих пухлинах. Стромальні лейкоцити та ендотелій судин слугували активним внутрішнім контролем якості імуногістохімічного дослідження. Експресії ER, ПР та Ki-67 виявлено у всіх зразках пухлини, яка у середньому складала $58.8\pm 12.7\%$, $42.4\pm 12.2\%$ та $45.8\pm 16.1\%$ відповідно. Наявність експресії p53 виявлено лише у 16.7% випадків. Приклади позитивної експресії вищевказаних білків зображено на рисунку 1.12.

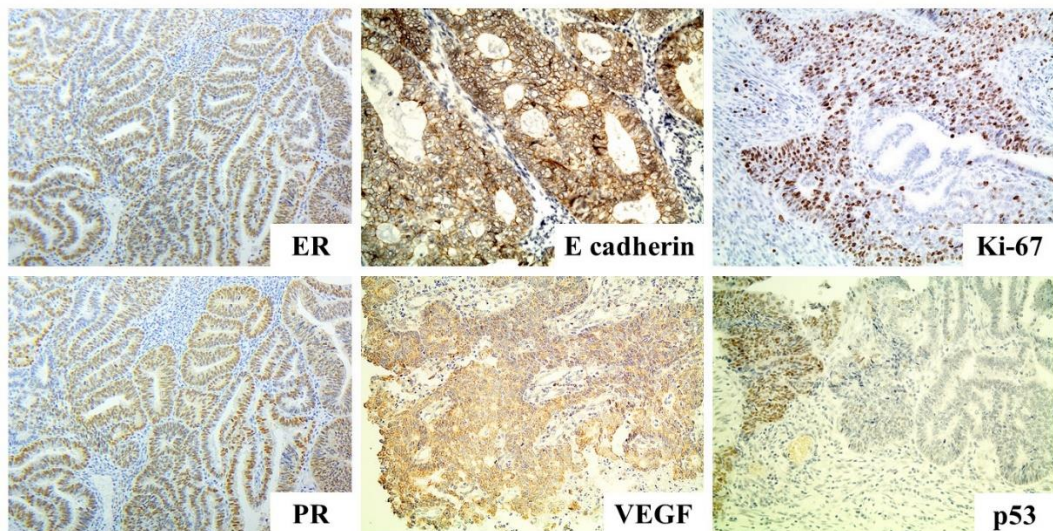


Рисунок 1.12 – Тканина ЕА з експресіями ER, ПР, Е-кадгерину, VEGF, Ki-67 та p53, виявлені при імуногістохімічному дослідженні. Збільшення x200.

При імуногістохімічному дослідженні експресії CD31 виявлено, що тканина ЕА має різний ступінь неоваскуляризації (рис. 1.13). В одному полі зору мікроскопу при збільшенні $\times 200$ ми виявляли від 5 до 37 судин. У середньому МСЩ складала 19.2 ± 7.5 . Як зазначалося раніше, більш агресивні (G2 та G3) ($F=6.34$, $p=0.0055$) та розповсюджені (стадія 2 та 3) ($F=10.33$, $p=0.0005$) пухлини мали вищу МСЩ, яка не залежала від віку пацієнтів ($r=-0.002$, $p=0.99$).

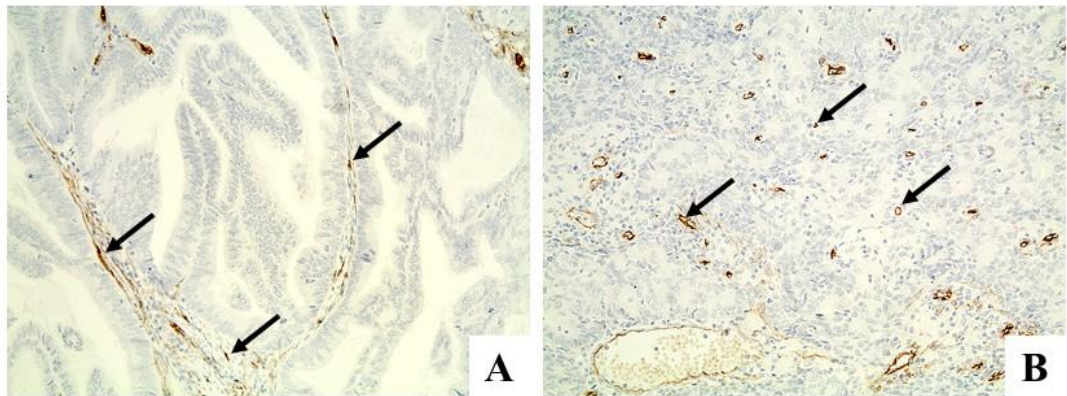


Рисунок 1.13 – Тканина ЕА з експресією CD31. Тут представлені зразки ЕА з незначною та вираженою васкуляризацією (судини показують позитивний ДАБ-сигнал та помічені стрілкою). Збільшення $\times 200$.

Наше дослідження демонструє наявність позитивної кореляції між експресією ЕР і ПР ($r=0.37$, $p=0.046$). Кореляції між експресією ЕР та Ki-67 ($r=-0.5$, $p=0.0045$), ПР та Ki-67 ($r=-0.62$, $p=0.0003$) були негативними. Тканина ЕА з експресією p53 мала нижчі показники експресії Е-кадгерину ($u=22.5$, $p=0.014$), вищі показники VEGF ($u=29.0$, $p=0.049$) та Ki-67 ($u=14.0$, $p=0.0074$).

Окрім цього ми виявили, що МСЩ залежала не тільки від морфологічних характеристик карцином (їх ступеню), але і від рецепторного профілю неопластичних клітин (рис. 1.14). Вищі показники МСЩ спостерігалися при зниженні експресії Е-кадгерину ($F=4.56$, $p=0.0197$) та надекспресії VEGF ($F=4.38$, $p=0.0225$). Одночасно, ми спостерігали посилення МСЩ при пригніченні експресії ПР ($r=-0.5$, $p=0.005$) та посиленні проліферативної активності клітин ($r=0.5$, $p=0.0047$). Важливо відмітити, що

випадки з метастатичним поширенням карциноми у лімфатичні вузли також мали значно більшу МСЦ ($u=20.5$, $p=0.0003$) порівняно з неметастатичними карциномами. При цьому також слід зазначити, що серед інших гістологічних та імуногістохімічних характеристик ЕА тільки експресія ПР мала вплив на їх метастатичний потенціал – ЕА з наявністю метастазів у лімфатичні вузли мали менші рівні експресії ПР ($u=43.0$, $p=0.0086$).

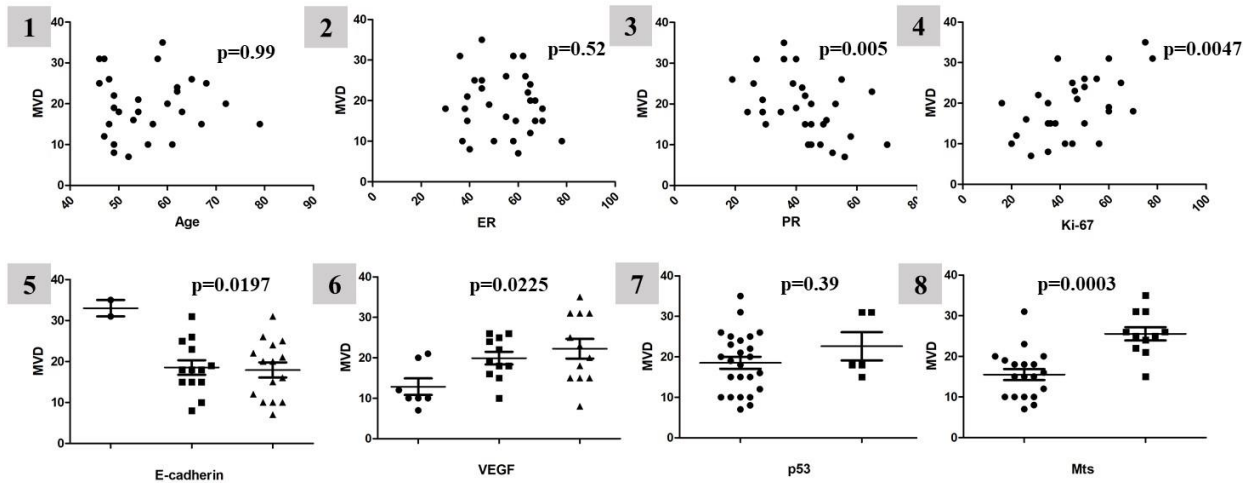


Рисунок 1.14 – Дослідження залежності між МСЦ та віком пацієнтів, експресіями ЕР, ПР, Кі-67, Е-кадгерину, VEGF, p53 та її впливу на метастазування ЕА. На наявність статистичної достовірності вказує $p < 0.05$. 1-4 – аналіз коефіцієнта кореляції Спірмена, 5-6 – дисперсійний аналіз, 7-8 – аналіз Манна-Уїтні.

Наше дослідження показало, що інтенсивність ангіогенезу у тканині ЕА залежить від ступеню пухлин та стадії по FIGO. Ми спостерігали зростання МСЦ при дедиференціюванні пухлин та їх поширенні. При цьому вона не залежала від віку хворих. Виражений вплив на васкуляризацію тканин ЕА мав рецепторний профіль пухлинних клітин. Ми виявили зростання МСЦ при депресії експресії Е-кадгерину та ПР; посиленні експресії VEGF та Кі-67. Зв'язок рівня васкуляризації тканин з експресіями ПР, Е-кадгерину та проліферативною активністю клітин ми вбачаємо у синхронній варіації якісних та кількісних характеристик неопластичної тканини при прогресуванні та дедиференціюванні ЕА.

Натомість, посилення МСЦ при надекспресії VEGF є проявом функціональної активності цих білків, які при вивільненні з неопластичних клітин стимулюють утворення нових судин у пухлині та навколо неї, стимулюючи проліферацію та міграцію ендотеліальних клітин, а також деградацію позаклітинного матриксу. Результатом цього, з одного боку, є зростання забезпечення тканини карцином киснем та необхідними речовинами, стимулюючи пухлини до збільшення. З іншого боку, новоутворені судини мають підвищену проникність стінки, яка стає вхідними воротами для пухлинних клітин і їх лімфогенного та гематогенного метастазування. Саме це ми показали у нашій роботі – посилення МСЦ супроводжувалося більш частим метастазуванням ЕА у лімфатичні вузли. Схема взаємозв'язку між прогресуванням пухлин, посиленням МСЦ та метастазуванням карцином зображена на рисунку 1.15.

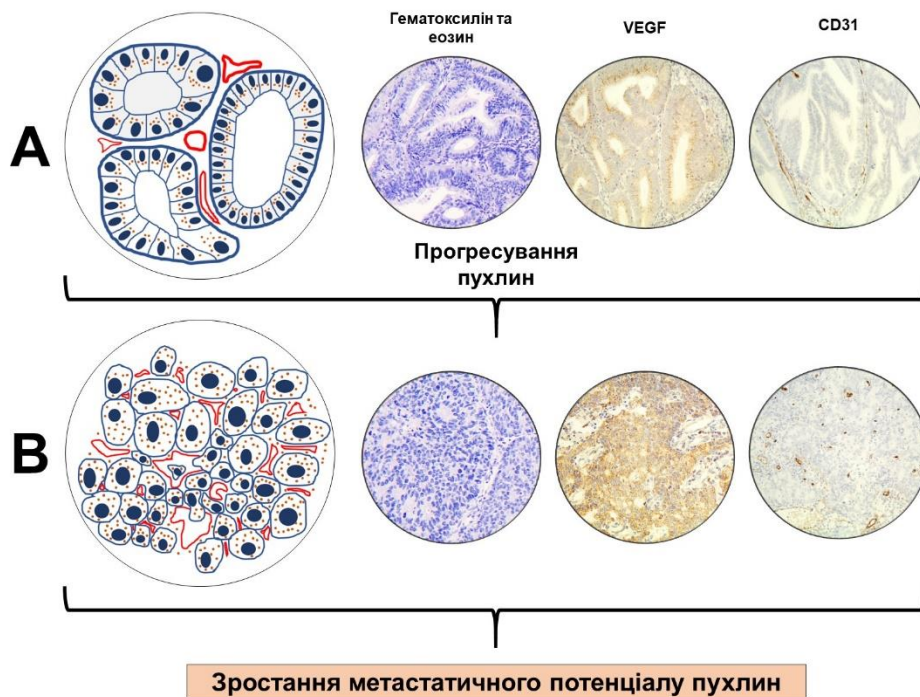


Рисунок 1.15 – Схема зростання МСЦ у тканині ЕА при прогресуванні карцином (зміні ступеню) та варіабельності рецепторного профілю пухлинних клітин. А: Низький рівень МСЦ у низького ступеню злоякісності ЕА. Пухлинні клітини з переважно перинуклеарним (на апікальній стороні) розташуванням VEGF (на схемі позначено рожевим кольором). Низька ймовірність потрапляння VEGF у екстрацелюлярні тканини. В: Високий рівень МСЦ у високого ступеню злоякісності ЕА. Пухлинні клітини з

дифузним розташуванням VEGF. Легка можливість потрапляння VEGF у екстрацелюлярні тканини зі стимуляцією ангиогенезу.

Наші результати також підтвердили раніше опубліковані дані про вплив ступеню ЕА на експресію прогностично важливих білків. Дедиференціювання карцином супроводжувалося пригніченням експресії Е-кадгерину, ЕР та ПР. При цьому спостерігалось посилення експресії VEGF, p53 та Ki-67. Крім того, ми виявили позитивну кореляцію між експресією ЕР та ПР; негативні кореляції між експресією ЕР та Ki-67, ПР та Ki-67. Це свідчить про синхронність виникнення морфологічної та імунологічної анаплазії при прогресуванні ЕА та можливості прогнозування перебігу захворювання, використовуючи дані гістологічного та імуногістохімічного дослідження біопсійного матеріалу.

Різницю в експресії рецепторів у тканині ЕА між різними стадіями по FIGO ми виявили лише для ПР. ЕА з наявністю метастазів у лімфатичні вузли мали також менші рівні експресії ПР. На нашу думку, саме наявність та рівень експресії ПР є більш прогностично важливим індикатором. Про це повідомлялося і раніше, але дослідження стосувалися раку молочної залози, а не ЕА.

1.3 Експресія молекул клітинної адгезії у тканині ендометрію та ендометріюїдних аденокарцином

Особливості експресії неопластичними клітинами молекул міжклітинної адгезії є надійним прогностичним фактором при прогресуванні злоякісних пухлин. Одним з важливим індикатором прогресування карцином є Е-кадгерин, який визначає силу міжклітинної адгезії та здатності клітин до розповсюдження. Зниження експресії цих білків супроводжується зростанням метастатичного потенціалу пухлин та зниження виживаності хворих [48]. Серед інших молекул адгезії останнім часом значна увага прикута до молекул клітинної адгезії раково-ембріонального антигену 1 (МКА-РЕА1).

Неодноразово повідомлялося про участь цих білків у цьому процесі [49]. Незважаючи на це, відомості про адгезивні властивості МКА-PEA1 мають певні розбіжності. Згідно S. Hammarstrom у фізіологічних умовах МКА-PEA1 не беруть участі в міжклітинній адгезії, враховуючи їх апікальну локалізацію на поляризованих клітинах.

Метою нашого дослідження стало вивчення особливостей експресії E-кадгерину та МКА-PEA1 у нормальному ендометрії та при ендометріюїдних аденокарциномах.

Результати дослідження та їх обговорення. Експресія МКА-PEA1 була виявлена на апікальній поверхні люмінального та залозистого циліндричного епітелію функціонального та базального шарів нормального ендометрію. Безперервне розташування МКА-PEA1 на клітинних поверхнях створювало враження бар'єру між зовнішнім середовищем та підлеглими тканинами матки. ІГХ дослідження експресії МКА-PEA1 у тканині ендометріюїдних ендометріальних карцином виявило їх виражене гетерогенне розташування у пухлинних клітинах. У переважній більшості випадків МКА-PEA1 локалізувалися на апікальній поверхні епітеліальних клітин. Під час дедиференціювання пухлин вони зникають з поверхні клітини. Водночас їх фокальна експресія в цитоплазмі пухлинних клітин та по всій їх мембрані була виявлена в 6 випадках. Ці патерни експресії виявлялися виключно в солідних ділянках неопластичної тканини та супроводжувались вираженим ядерним атипізмом новоутворених клітин (рис. 1.16).

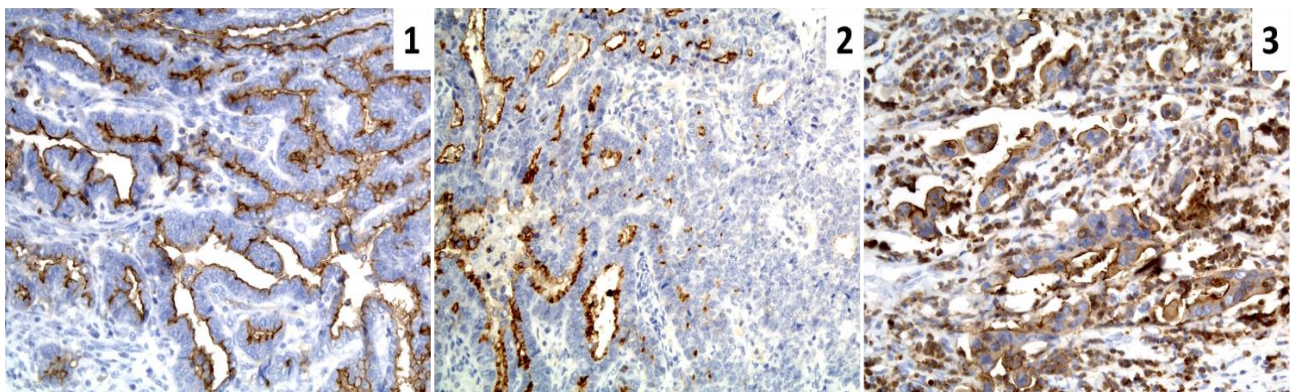


Рисунок 1.16 – ЕЕА. 1 – апікальна мембранна експресія; 2 – гетерогенна експресія (наявність рецептор-позитивних та рецептор-негативних вогнищ);

3 – мембрано-цитоплазматична експресія. ІГХ дослідження МКА-РЕА1.

Збільшення x200.

На протипагу МКА-РЕА1, в нормі Е-кадгерин локалізується у міжклітинних контактах та епітеліально-мезенхімальних з'єднаннях. При цьому, клітини ЕЕА мають різний ступінь інтенсивності прояву експресію цих білків та локалізацію їх на клітинній мембрані: базально-міжклітинну – при утворенні залоз пухлинними клітинами та суцільно-мембранозну – при солідному рості пухлин. Спостерігається зменшення інтенсивності експресії Е-кадгерину при дедиференціюванні карцином ($p < 0,05$), яке супроводжувалося наростанням ядерного поліморфізму ракових клітин та вогнищевим відокремленням клітин від загальної пухлинної маси. Нами також не виявлено будь-якої закономірності у ко-експресії МКА-РЕА1 з Е-кадгерином у неопластичній тканині – як МКА-РЕА1-позитивна, так і МКА-РЕА1-негативна тканина були Е-кадгерин – позитивними. Рецептори Е-кадгерину візуалізувалися між пухлинними клітинами та в контактах клітин з позаклітинним матриксом, за винятком тих частин їх мембрани, які обмежували просвіти залозисто-тубулярних пухлинних структур (рис. 1.17).

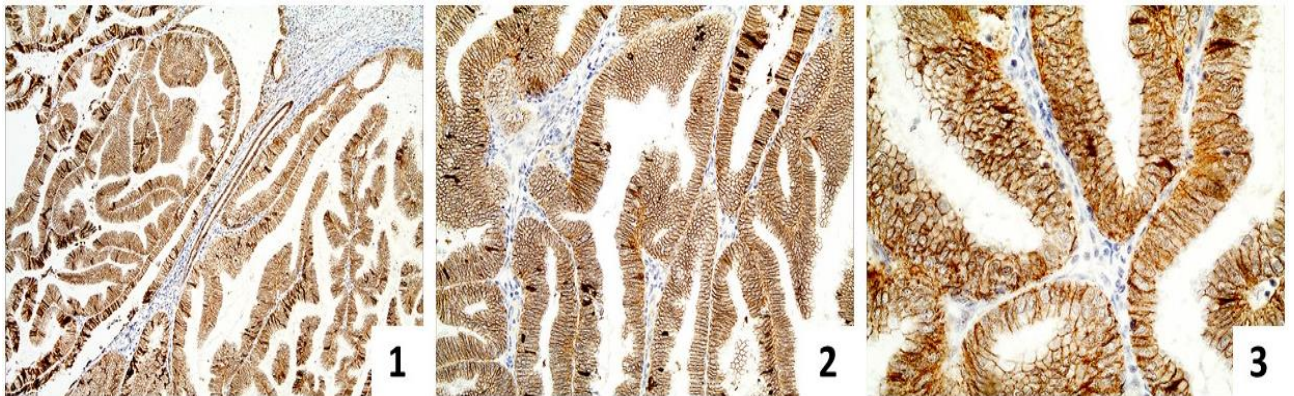


Рисунок 1.17 – ЕЕА. ІГХ дослідження МКА-РЕА1.

Збільшення 1 – x100, 1 – x200, 1 – x400.

На сьогоднішній день відкритим залишається питання про участь МКА-РЕА1 у міжклітинній адгезії. Одні дослідження демонструють участь цих «молекул клітинної адгезії» у посиленні міжклітинних контактів, взаємодіючи з інтегринами, філаміном А, остеопонтіном [49,51]. Інші показують їх

інертність по відношенню до міцності міжклітинних з'єднань [50]. Значна кількість робіт вказує навіть на пригнічення адгезії при експресії МКА-РЕА нормальними та пухлинними клітинами (наприклад регулюючи N-кадгерин) [52]. Для встановлення факту впливу МКА-РЕА на силу міжклітинного з'єднання нами виконано порівняння їх експресії з найбільш вивченим маркером адгезії E-кадгерином [48]. Отримані дані демонструють експресію цих білків у міжклітинних контактах нормальних та пухлинних епітеліальних клітин та їх з'єднаннях з ПКМ (за винятком тих частин їх мембрани, які обмежували просвіти залозисто-тубулярних пухлинних структур).

Нами не виявлено загальних закономірностей у маніфестації МКА-РЕА1 та E-кадгерину, підтвердженням чого стало експресія E-кадгерину у МКА-РЕА1-позитивній та МКА-РЕА1-негативній пухлинній тканині; відсутність експресії E-кадгерину на апікальній поверхні клітин в нормі та при формуванні пухлинними клітинами залозистих структур, де переважно локалізувалися МКА-РЕА1. Слід вказати, що деякі дослідження акцентують увагу на тому, що експресія МКА-РЕА у клітинах при ІГХ дослідженні не є стовідсотковим індикатором їх наявності чи відсутності виключно у тих патернах, де виявляється позитивний сигнал. Вони можуть локалізуватися й у інших місцях, які є недоступними (можливо з-за малої їх кількості там) для виявлення їх цими методами дослідження [53], що на нашу думку є зовсім неприпустимим.

Все вищезазначене вказує на функціональну інертність МКА-РЕА щодо міжклітинної адгезії. З іншої сторони, важко собі припустити, що б відбувалося з просвітами органів та залоз, якби ці білки дійсно мали адгезивні властивості щодо епітеліальних клітин – це б унеможливило наявність просвітів та порожнин за рахунок злипання протилежно розташованих стінок органів та залозисто-тубулярних структур. Ми погоджуємося, що ці молекули адгезії дійсно мають адгезивні властивості до якихось неепітеліальних біологічних об'єктів (бактерії, віруси, тощо), але не одні до одного.

1.4 Морфологічні та імуногістохімічні особливості плоскоклітинного раку шийки матки

Найбільш розповсюдженою злоякісною пухлиною шийки матки є плоскоклітинний рак (ICD-O 8070/3), який займає друге місце серед усіх карцином у жінок [54]. Основним етіологічним фактором його виникнення є папіломавірус 16 людини [55], хоча підґрунтям для цього можуть бути різні інші місцеві та загальні патологічні стани (запалення, спадковість, імунодефіцит, тощо) [56-58]. Інвазивний плоскоклітинний рак шийки матки має чисельні патерни росту, варіабельність клітинного поліморфізму та ступенів диференціювання. Здатність до кератинізації з утворенням «ракових перлин» та ступінь клітинного плеоморфізму визначають розподіл цих пухлин на низько- (low-grade) та високо-агресивні (high-grade) карциноми. При чому, кератинізація не завжди є ознакою low-grade пухлин [59]. Перебіг захворювання залежить від стадії захворювання, віку пацієнтів, глибини інвазії пухлини та наявності метастатичного розповсюдження карцином. У якості прогностичних маркерів виступають експресія пухлинними клітинами p53, VEGF, EGFR, HER2, тощо [60,61].

Метою нашого дослідження стало вивчення морфологічних та імуногістохімічних особливостей тканини інвазивного плоскоклітинного раку шийки матки.

Результати дослідження та їх обговорення. В Україні та Сумській області спостерігається висока захворюваність на злоякісні новоутворення шийки матки (рис. 1.18), які протягом останніх десятиліть мають тенденцію до «омолодження». Щороку у нашій державі виявляється у середньому 4392 нових випадки, що становить 5,8% від пухлин усіх локалізацій. Показники Сумської області протягом останніх років знаходяться майже на рівні загальнодержавних – лише з 2014 року вони дещо їх перевищують.

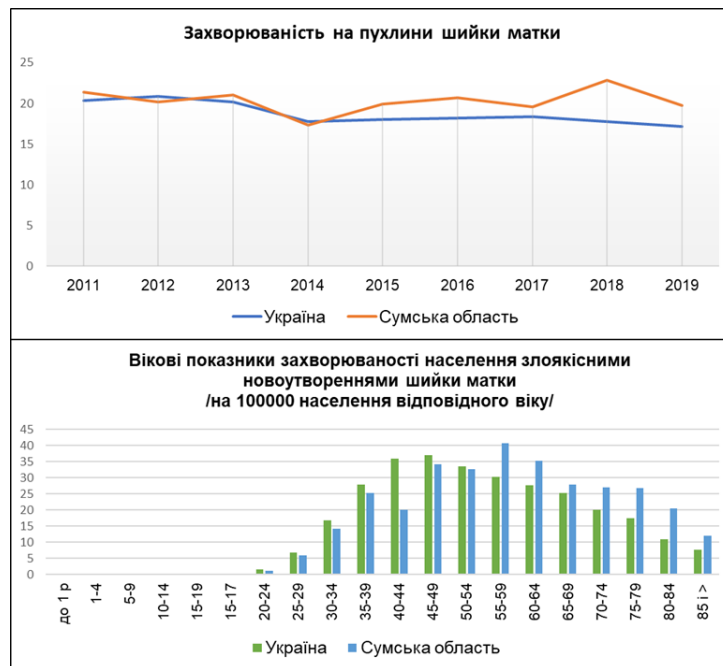


Рисунок 1.18 – Статистичні показники захворюваності на пухлини шийки матки в Україні та Сумській області.

Аналіз вікового розподілу вищезазначеної патології доводить, що рак шийки матки може вражати жінок будь-якого віку (окрім дітей). Починаючи з 25 років, спостерігається стрімке зростання захворюваності, яка досягає свого піку в Україні в цілому у 50 років. У Сумській області найвищі показники виявлення пухлин шийки матки відзначаються на 10 років пізніше.

Тканина інвазивного плоскоклітинного раку шийки матки при збереженні диференціювання пухлинних клітин містить значну кількість кератину та утворює в центрах анаплазованого епітелію «ракові перлини». Неопластичні клітини мають еозинофільну цитоплазму (при збереженні здатності до кератиноутворення), великі гіперхромні ядра, «міжклітинні містки». При дедиференціюванні новоутворень межі клітин стають менш чіткими, об'єм цитоплазми поступово зменшується, збільшуються розміри ядер, які набувають високого поліморфізму. Мітотична активність виражена по-різному, досягаючи найвищих показників по периферії пластів та тяжів у диференційованих пухлинах (рис. 1.19).

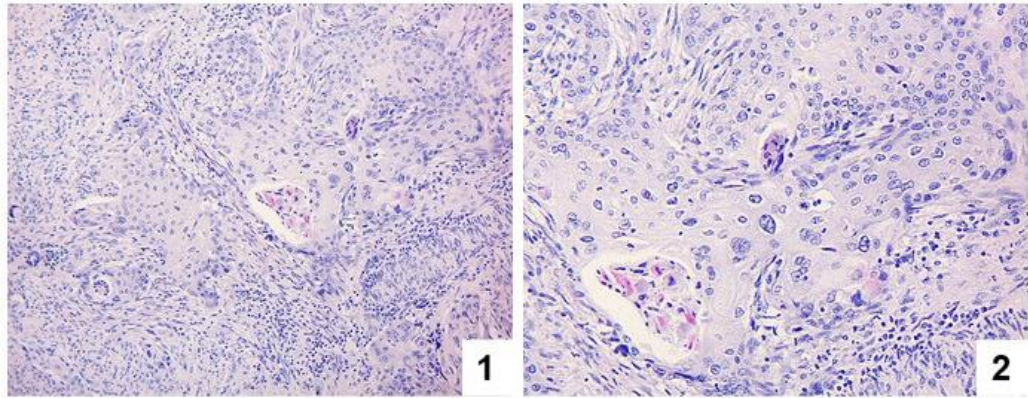


Рисунок 1.19 – Інвазивний плоскоклітинний рак шийки матки. Забарвлення гематоксилином та еозином. Збільшення: x100 (1) та x200 (2).

Десмопластична строма дифузно інфільтрована імуноцитами. Залежно від здатності пухлинних клітин до кератинізації та ступеню ядерного поліморфізму всі плоскоклітинні карциноми розподілено на високо- (виражена кератинізація з утворенням «перлин» та низький рівень ядерного поліморфізму), помірно- (залишкова кератинізація та помірний ядерний поліморфізм) та низько-диференційовані (відсутність кератинізації та варіюваний поліморфізм). У вибірці для дослідження було 7 випадків високо-, 15 випадків помірно- та 8 випадків низько-диференційованих пухлин. Не виявлено залежності між віком жінок та ступенем агресивності пухлин ($r = -0,19$, $p = 0,29$). Ця закономірність зберігалась і у групах диференціювання плоскоклітинного раку ($F = 1,33$, $p = 0,28$).

При ІГХ дослідженні тканини плоскоклітинного раку шийки матки встановлено, що вона у 83% випадків має варіабельну експресію МКА-РЕА1 та МКА-РЕА6. Слід зазначити, що МКА-РЕА6 були наявні виключно в МКА-РЕА1-позитивних зразках. У 43% випадків неопластична тканина мала вогнищеву експресію МКА-РЕА5, яка також локалізувалась у МКА-РЕА1- та МКА-РЕА6-позитивних ділянках пухлини. Крім суцільної мембранної експресії МКА-РЕА1, 5 та 6, ці білки завжди локалізувалися у цитоплазмі неопластичних клітин. Виявлено чітку закономірність у їх маніфестації – рецептор-позитивні клітини були наявні у більш диференційованих ділянках

пухлинної тканини (у клітинах з тенденцією до кератинізації), які розташовувались більш прицентрово у вогнищах неопластичного росту. Ми не встановили статистично достовірної відмінності у експресії МКА-РЕА1 та 6 при різних ступенях диференціювання карцином ($F=1,66$, $p=0,21$). Хоча при цьому виявлено достовірну різницю для МКА-РЕА5 у трьох групах пухлин залежно від гістологічного їх варіанту ($F=8,93$, $p=0,0011$). Окрім цього, нами не виявлено вікової залежності в експресії МКА-РЕА1, 5 та 6 ($t=1,23$, $p=0,23$, $t=0,086$, $p=0,93$ та $t=1,23$, $p=0,23$ відповідно).

У тканині плоскоклітинного раку шийки матки фокусну експресію ER та PR у неопластичних клітинах виявлено у 37% та 20% випадків, відповідно. Слід зазначити, що стромальні клітини мали більш виражену експресію цих рецепторів, порівнюючи з раковими клітинами. Нами не виявлено залежності у маніфестації цих білків від ступеня диференціювання пухлин ($F=0,3$, $p=0,74$ для ER та $F=0,28$, $p=0,76$) та їх коливання при наростанні їх злоякісності ($r=-0,16$, $p=0,39$ та $r=-0,15$, $p=0,43$, відповідно). Статистичний аналіз не виявив залежності в експресії ER та PR від МКА-РЕА-профілю пухлин. Це стосувалося як МКА-РЕА1 ($t=0,74$, $p=0,47$ та $t=0,22$, $p=0,83$, відповідно), так і МКА-РЕА5 ($t=0,57$, $p=0,57$ та $t=0,54$, $p=0,6$, відповідно) та МКА-РЕА6 ($t=0,45$, $p=0,66$ та $t=0,37$, $p=0,71$, відповідно). При аналізі ІГХ досліджень підтверджено отримані статистичні дані – при серійних зрізах тканин не виявлено ко-експресії МКА-РЕА з рецепторами до жіночих статевих гормонів (рис. 1.20).

У пухлинній тканині виявлено експресію Ki-67 у всіх випадках, яка коливалася у діапазоні від 5 до 65%. Вона напряму залежала від ступеню диференціювання карцином ($F=13,91$, $p<0,0001$) та зростала при їх дедиференціюванні ($r=0,71$, $p<0,0001$). Так, у високо-диференційованих новоутвореннях проліферативний індекс склав 17,1%, у помірно-диференційованих – 35,3% та у низько-диференційованих – 50%. Нами не виявлено різниці експресії Ki-67 у ER-позитивних та ER-негативних групах тканин ($t=1,15$, $p=0,26$), а також залежності між варіабельністю їх маніфестації

у ІГХ-препаратах ($r=0,053$, $p=0,23$). Те саме стосується і PR ($t=0,91$, $p=0,37$ та $r=0,06$, $p=0,24$).

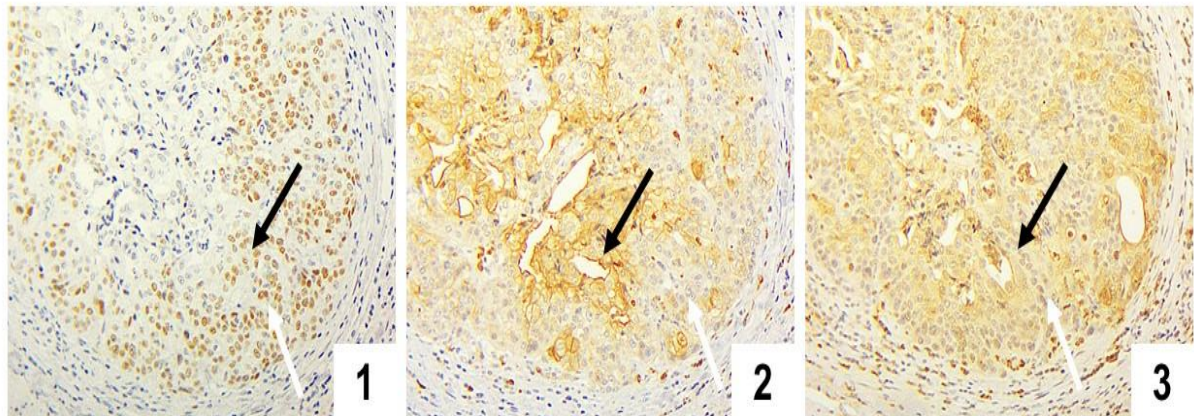


Рисунок 1.20 – Тканина плоскоклітинного раку шийки матки. Наявність (чорна стрілка) та відсутність (біла стрілка) експресії МКА-РЕА у ER-позитивній тканині. ІГХ дослідження експресії ER (1), МКА-РЕА1 (2) та МКА-РЕА6 (3). Збільшення: $\times 200$.

Статистичний аналіз особливостей експресії МКА-РЕА1 та Ki-67 не показав взаємозв'язку між ними. Не виявлено відмінностей проліферативного індексу тканин у МКА-РЕА1-позитивній та негативній групах пухлин ($t=2,031$, $p=0,051$). Незважаючи на це, при детальному аналізі серійних зрізів тканин нами відзначено МКА-РЕА1-залежну експресію Ki-67 у карциномах (рис. 1.21).

Ті ділянки новоутворень, що експресували МКА-РЕА1, мали виражено нижчий проліферативний індекс, порівнюючи з МКА-РЕА1-негативними вогнищами пухлин. «Гарячі» вогнища пухлини (з вираженою проліферативною активністю) зазвичай мали МКА-РЕА1-негативний профіль неопластичних клітин. І навпаки, при експресії МКА-РЕА1 ракові клітини набагато рідше експресували Ki-67.

Стосовно інших МКА-РЕА (5 та 6), то як при статистичному опрацюванні даних, так і при аналізі ІГХ-препаратів нами не виявлено будь-яких закономірностей. МКА-РЕА5 та 6-позитивні пухлини статистично не

відрізнялися за проліферетивним індексом від МКА-РЕА5 та 6-негативних новоутворень ($t=2,16$, $p=0,072$, $t=2,031$, $p=0,052$ та $t=0,595$, $p=0,56$, відповідно).

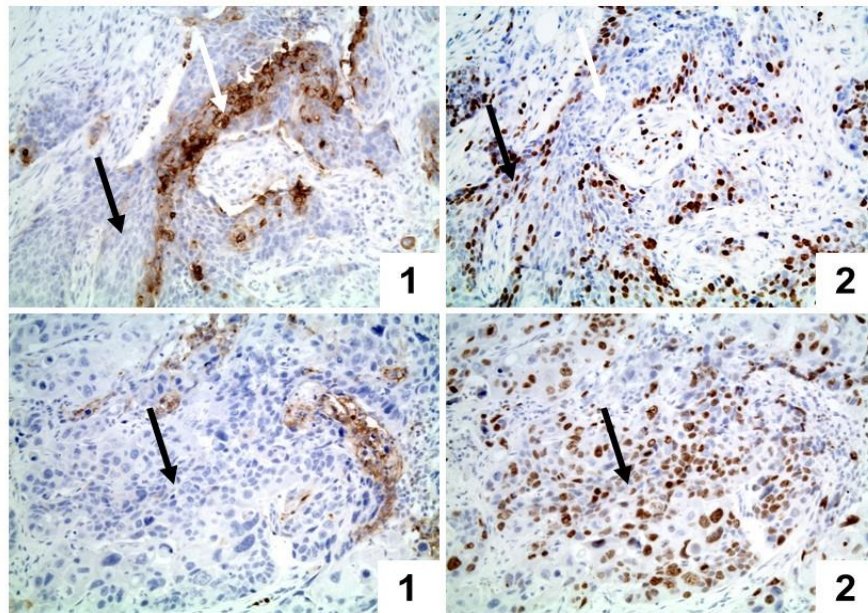


Рисунок 1.21 – Тканина плоскоклітинного раку шийки матки. Пухлинна тканина з гетерогенною експресією МКА-РЕА1: чорна стрілка – відсутність експресії, біла стрілка – наявність експресії. ІГХ дослідження експресії МКА-РЕА1 (1) та Кі-67 (2). Збільшення: x200.

Злоякісні пухлини є другою за частотою причиною смерті в усьому світі. Серед них карциноми органів чоловічої та жіночої статеві системи посідають лідируючу позицію як зі сторони захворюваності, так і смертності від них [1]. У жінок найбільш частою онкологічною патологією є карциноми молочної залози та органів статеві системи, рівень захворюваності яких як в Україні, так і в Сумській області знаходиться на стабільно високому рівні. Карциноми шийки матки виявляються у 5,8% випадків (пік у 50 років). Вони характеризуються зміною гістологічної будови неопластичної тканини при настанні злоякісності – зниження кератинізації неопластичної тканини та наростання ядерного атипізму.

При ІГХ дослідженні встановлено, що вони у переважній більшості випадків експресують МКА-РЕА1 та 6; майже у половині випадків виявлено

вогнищеву експресію МКА-РЕА5. Спостерігається чітка закономірність у маніфестації цих білків – наявність експресії МКА-РЕА6 виключно у МКА-РЕА1-позитивних ділянках пухлини; експресія МКА-РЕА5 у МКА-РЕА1 та 6-позитивних вогнищах. Тканина карцином мала позитивну експресію ER у 37% випадків; рецептори до прогестерону виявлялися у 20% зразків. Нами не встановлено залежності в експресії вищезазначених рецепторів від віку пацієнток та ступеню диференціювання пухлин.

Тканина плоскоклітинного раку мала різну проліферативну активність (від 5 до 65%), яка була незалежною від гормонального статусу неоплазій. При цьому виявлено пряму залежність проліферативного індексу карцином від диференціювання неопластичної тканини. Не зважаючи на відсутність статистичної залежності між проліферативним індексом пухлинної тканини та її МКА-РЕА-статусом, ми встановили, що вогнища пухлини з експресією МКА-РЕА1 мають значно нижчу проліферативну активність ракових клітин за МКА-РЕА1-негативні ділянки пухлини. Аналізуючи залежність проліферативної активності клітин від МКА-РЕА1-профілю, можна з впевненістю стверджувати, що ці молекули мають супресивний ефект на поділ клітин.

Інгібуючий вплив МКА-РЕА1 на інтенсивність поділу клітин може бути обумовлений значним спектром їх властивостей (рис. 1.22). Вони беруть участь у активації інгібіторів клітинного циклу; опосередковують МАРК Erk1/2 контактне інгібування проліферації епітеліальних клітин; спільно функціонуючи з білком дикого типу p53 при ушкодженні ДНК, вони блокують мітози в клітинах; взаємодіючи з IR та EGFR, знижують інтенсивність поділу клітин; за допомогою активації циклінзалежних інгібіторів кіназ, блокуванню активності FAS та зменшення фосфорилування Rb супресують поділ клітин; МКА-РЕА1-залежна транслокація β -катеніну в ядрі має мітоген-регулюючий ефект у клітинах; асоціація МКА-РЕА1 з білком PDIF38 призводить до варіацій інтенсивності поділу клітин [23].



Рисунок 1.22 – Механізми інгібуючого впливу МКА-РЕА1 на проліферативну активність клітин.

2 ДОСЛІДЖЕННЯ ВЗАЄМОДІЇ СЕАСАМ1 З ПАТОГЕННИМИ БІЛКАМИ

Бактерійний сепсис залишається основною причиною захворюваності у людей [1]. Сепсис, який виникає у жінок після пологів, пуерперальний сепсис, все ще призводить до смерті понад 75 000 жінок щорічно по всьому світу і є особливою проблемою в країнах, які розвиваються [2]. Пуерперальний сепсис також має історичне значення, оскільки епідемії пройшли через пологові відділення в XVIII і XIX століттях і різко збільшили материнську захворюваність та смертність [3-5]. Причина епідемій була дуже спірною і була пояснена лише завдяки піонерській роботі Ігнаца Земельвейса, який продемонстрував, що антисептичні техніки можуть запобігти захворюванню [4], та завдяки розвитку мікробної теорії. Таким чином, пуерперальний сепсис представляє собою типовий приклад нозокоміальної інфекції. Докази з часом накопичувались, що епідемії спричиняв грампозитивний бактерійний вид *Streptococcus pyogenes*, відомий як група А стрептококів (GAS) [5,6], але молекулярні основи цієї хвороби залишалися невідомими. Епідеміологічні дослідження повторно вказували на те, що антиген, позначений як R28 [7,8], який має властивості адгезину [9] і зазвичай знаходиться в штаммах emm28, пов'язаних із вибухами пуерперального сепсису викликаних *S. Pyogenes* [10-15]. Отже, виникає ключове питання: яка роль R28 і чи дозволяє він *S. pyogenes* подолати вроджені захисні механізми для виклику пуерперального сепсису? Ця проблема є актуальною з урахуванням глобального зростання випадків пуерперального сепсису, викликаного *S. Pyogenes* [2,16], та відсутності вакцин проти цього патогена. Крім того, відомості про пуерперальний сепсис, викликаний *S. pyogenes*, можуть надати інформацію, що стосується патогенезу пуерперального сепсису, викликаного іншими бактеріальними патогенами.

Людський імунomodуючий рецептор СЕАСАМ1 (молекула клітинної адгезії, пов'язана з карциноембріональним антигеном 1) з'єднується з деякими бактеріальними білками, які містять Ig-подібну структуру, позначену як IgI3

[17]. Рецептор CEACAM1, що входить до родини білків CEACAM, широко експресується на епітеліальних, ендотеліальних та імунних клітинах людини [18] і модулює клітинну активність [19,20] (рис. 2.1a).

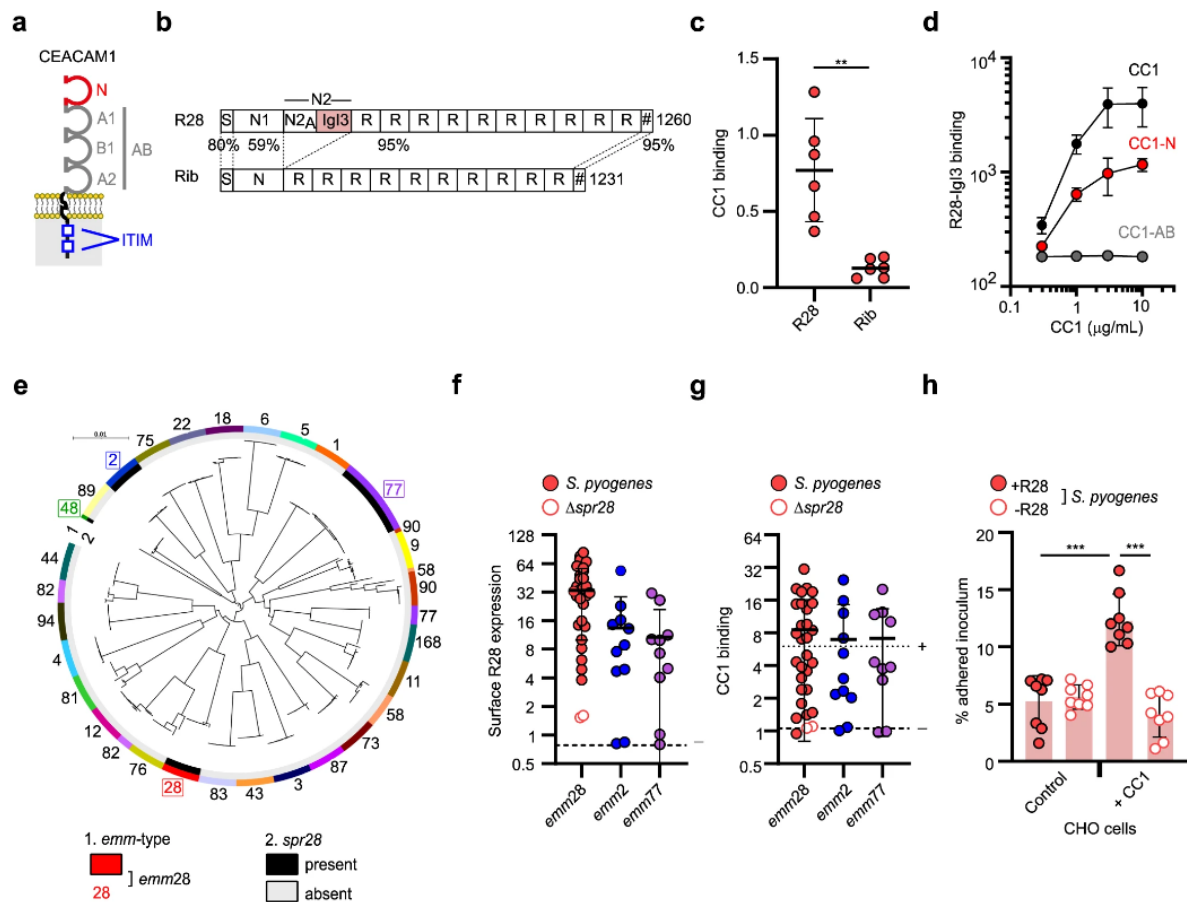


Рисунок 2.1 – Взаємодія адгезину R28 ізольованих штамів *S. pyogenes*, які викликають пuerперальний сепсис, з CEACAM1.

Тут показано, що R28, який має домен IgI3, специфічно спрямовується на CEACAM1 людського походження, щоб сприяти подіям, які в колективі сприяють розвитку пuerперального сепсису. Ці події включають підвищення бактеріальної адгезії до епітеліальних бар'єрів, втручання у загоснення епітелію, вродженої імунної відповіді та сприяння реплікації бактерій у крові. У той час як класично припускається, що патоген використовує відмінні молекулярні взаємодії для подолання кожного механізму захисту господаря, наші дані демонструють, що одна взаємодія може дозволити патогену подолати кілька бар'єрів імунного захисту на шляху до інвазивної хвороби.

Адгезин R28 S. pyogenes зв'язується з SEACAM1

Білок R28 включає в себе довгий ряд ідентичних повторів і унікальний N-кінцевий регіон, в якому знаходиться складення IgI3 у домені N2 (рис. 2.1b). Ми виконали біохімічний аналіз взаємодії між цілим R28 та білками SEACAM1, і виявили, що рекомбінантний (r)SEACAM1 зв'язувався з іммобілізованим R28, ізольованим з клітинної стінки *S. pyogenes*, а також з білком β *S. agalactiae*, як раніше описано. На відміну від цього rSEACAM1 не зв'язувався з іншими очищеними поверхневими білками стрептококів, що були протестовані, включаючи Rib *S. agalactiae*, який тісно пов'язаний з R28, але не має N2-частини та області IgI3 (рис. 2.1b,c) [9,21]. У доповнюючому тесті очищений R28 взаємодіяв безпосередньо з іммобілізованим rSEACAM1 залежно від концентрації. Для взаємодії був достатній IgI3-домен R28, а N-кінцевий домен SEACAM1 був необхідний та достатній для взаємодії (рис. 2.1d), як показано в прямих тестах зв'язування. У відповідності до цих результатів зв'язування R28-IgI3 специфічно блокувалось антитілом до SEACAM1-N та білком *Helicobacter pylori* HopQ, який зв'язується з SEACAM1-N [22]. Ці дані свідчать про те, що R28 та SEACAM1 взаємодіють через свої IgI3 та N-домени, відповідно.

Оскільки R28 значно переважає серед штамів *S. pyogenes*, які викликають пuerперальний сепсис [8,10-12,14,15], було цікаво вивчити, чи взаємодіють клінічні ізольовані штами *S. pyogenes* з SEACAM1. Спочатку ми проаналізували розподіл гена (*spr28*), який кодує R28, у повних геномних послідовностях 3886 ізольованих *S. pyogenes*, що представляли 77 emm-типів, і виявили, що ізольовані, що належать до ліній emm2, emm28 та emm48, а також одної з двох ліній emm77, часто містять ген *spr28* (рис. 2.1e). Серед цих ліній ізольовані, які належать до emm28 (серотип M28), є найпоширенішими серед штамів, які викликають вибухи пuerперального сепсису. Наш аналіз підтримує попередні спостереження [13,23] і відповідає висновку, що ген *spr28* розташований на пересувному генетичному елементі [24]. Носіння гена *spr28*, поверхневий вираз білка R28 та здатність зв'язування з SEACAM1 були

оцінені для великої колекції штамів, які належать до ліній emm28, emm2 чи emm77, і включають ізольовані випадки пуерперального сепсису. З них 28/28 штамів emm28, 9/11 штамів emm2 та 8/10 штамів emm77 містили ген spr28. Аналіз експресії показав, що всі штами, які несли ген spr28, виражали R28, при найвищому виразі у штамів emm28 (рис. 2.1f), до яких включений ізольований випадок пуерперального сепсису з 1930-х років. Зв'язування з CEACAM1 було спостережено для більшості ізольованих *S. pyogenes* (рис. 2.1g,) і залежало від концентрації. Як очікувалося, два мутанти *S. pyogenes*, що не несли гена spr28, не мали поверхневого виразу R28 та не зв'язувалися з CEACAM1 (рис. 2.1f,g). Варіація зв'язування з CEACAM1, ймовірно, зумовлена різницею в експресії R28, підтримується позитивною кореляцією і обумовлена мутаціями в міжгенному регіоні, які впливають на рівень транскрипції spr28. Для аналізу зв'язування за більш фізіологічних умов була вивчена здатність *S. pyogenes*, які експресували R28, адгезивно зв'язуватися з поверхнею клітини китайського хом'яка (CHO), і виявлено, що експресія людського CEACAM1 підсилює взаємодію за механізмом, залежним від R28 (рис. 2.1h). Ці дані демонструють, що штами *S. pyogenes*, які експресують R28, мають підвищену здатність адгезії до епітеліальних клітин завдяки взаємодії з людським CEACAM1.

R28 зв'язується з CEACAM1 з високою специфічністю

Для вивчення специфічності CEACAM1 як рецептора для адгезину R28 ми оцінили, чи взаємодіє R28 з іншими білками мембрани, що експресуються на поверхні клітини людини. Високопродуктивне скринінгове вивчення зв'язування R28 та тісно пов'язаного білка Rib з 3359 клітинними лініями (походженням з 2625 унікальних генів) було виявлено за допомогою кроличого антисирового сироватка проти Rib (рис. 2.2a), яке визначає як R28, так і Rib9. Екран виявив підвищені сигнали для 45 клітинних ліній порівняно з контрольною клітинною лінією (рис. 2.2b). Додаткова характеристика цих результатів показала, що білок R28, але не білок Rib, специфічно зв'язувався лише з клітинною лінією, яка експресує CEACAM1 (рис. 2.2b).

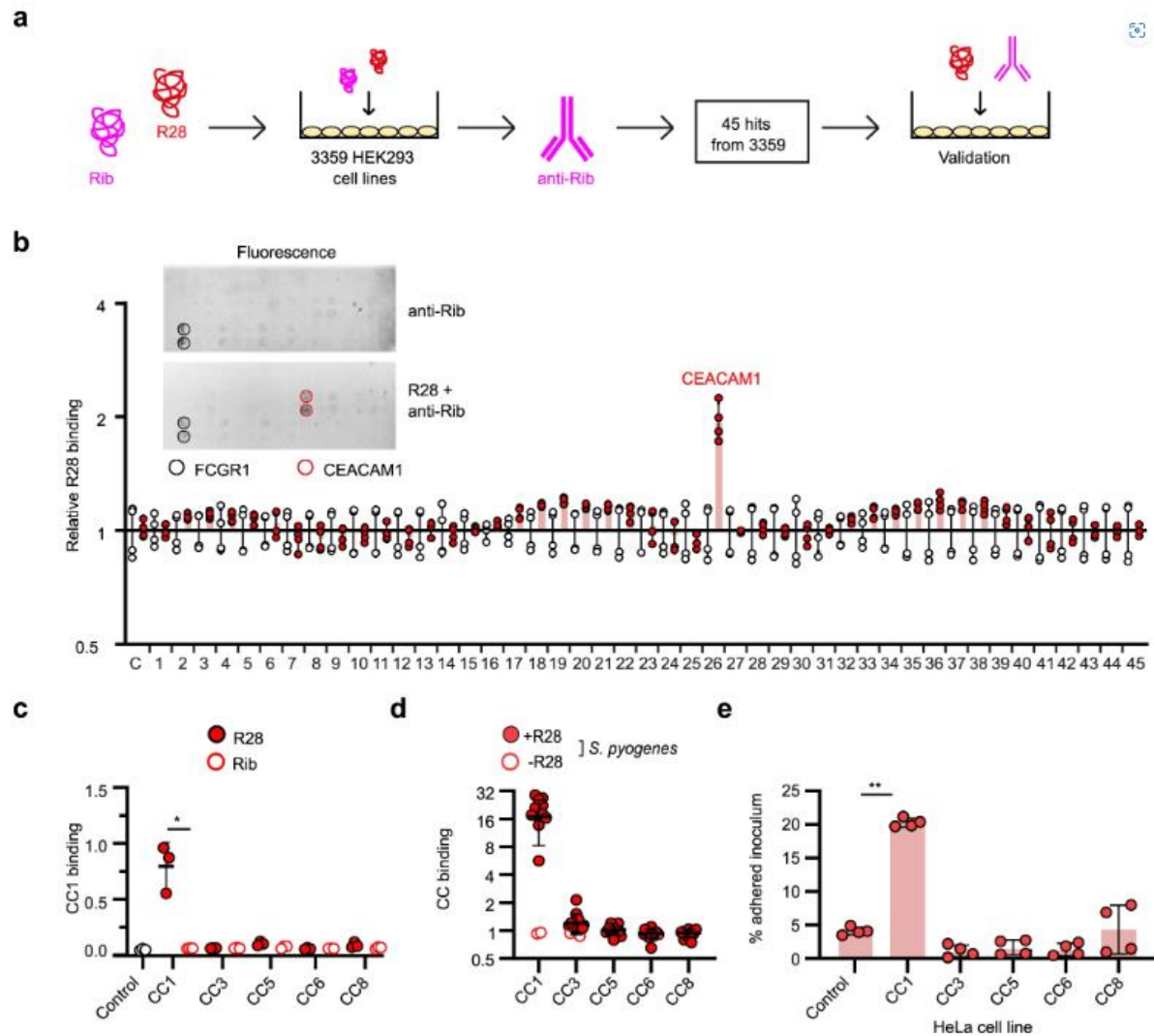


Рисунок 2.2 – CEACAM1 є високоспецифічним рецептором для адгезину R28.

В людських клітинах можуть бути виражені дванадцять різновидів сплайсінгу CEACAM1 з різними характеристиками, включаючи ті, які є вбудованими у мембрану, або ті, які є розчинними. Вони відносяться до підродини рецепторів CEACAM, які мають високу послідовність (~90% ідентичність) та структурну гомологію. Однак CEACAM1-4L є основним експресованим ізоформом та єдиним членом, що містить домени ITIM і подальші імуномодулюючі функції [18]. Оскільки R28 не зв'язувався з клітинами HEK293, що експресують пов'язані рецептори CEACAM1 (CEACAM3, CEACAM5, CEACAM6 та CEACAM8), ми попередньо припустили, що R28 зв'язується з високою специфічністю до CEACAM1 на

цільових клітинах. Біохімічні та клітинні аналізи проводилися з очищеними препаратами R28 та інших членів родини рецепторів CEACAM. Взаємодії між R28 та rCEACAM3, rCEACAM5, rCEACAM6 або rCEACAM8 не виявлено в імуноензимному аналізі (рис. 2.2c) чи в аналізах ізотермічної калориметрії. Додатково, бактерії *S. pyogenes*, що експресують R28, не зв'язувалися з rCEACAM3, rCEACAM5, rCEACAM6 або rCEACAM8 в аналізах проточної цитометрії (рис. 2.2d). Зокрема, значно вищий відсоток інокулюму бактерій *S. pyogenes*, які експресують R28, адгезивно зв'язувався з клітинами HeLa, що експресують CEACAM1, порівняно з клітинами HeLa, які експресують інші члени родини CEACAMs (рис. 2.2e). Узявши разом ці дані, вони вказують на те, що CEACAM1 на епітеліальних клітинах є високоспецифічним рецептором для адгезину R28 *S. pyogenes*.

Структура комплексу R28-CEACAM1

Структурна інформація є важливою не лише для розуміння того, як R28 взаємодіє зі своїм рецептором CEACAM1, але й для розуміння того, як R28 може бути метою стратегій антивірулентного впливу. Ми вирішили структуру R28-IgI3, зв'язаного з CEACAM1-N з роздільною здатністю 3,05 Å (рис. 2.3a). Асиметрична одиниця містить чотири копії комплексу (R28-IgI3)-(CEACAM1-N). Порівняння комплексів показало малюсіньку різницю між ними (середньоквадратичне відхилення 0,188–0,406 Å), і всі аналізи були виконані з використанням ланцюгів E та F. Домен R28 має складену фігуру, що відноситься до підмножини IgI3, яку ми недавно визначили як домен бета-білка з *S. agalactiae*, що зв'язується з CEACAM1 та CEACAM5 [17]. Зокрема, R28-IgI3 має такі властивості фігури IgI3: стрічки A' та A'', відсутність стрічок C' та C'', та скорочена стрічка C. Відзначеною різницею між структурою домена R28-IgI3 та доменом β -IgI3 є наявність в R28-IgI3 мотиву "гвинт-поворот-гвинт" (НТН) між стрічками C та D.

Ми наступним кроком оцінили механізм взаємодії між R28-IgI3 та CEACAM1-N. У комплексі R28-IgI3 спрямовується на інтерфейс димеризації CEACAM1-N (грань A'GFCC'C'') за допомогою кишені амінокислот (K45,

Y61, K64), які мають високий електростатичний потенціал (рис. 2.3a). Далі ми визначили амінокислоти A55, E49, I52, I53 та I59 в R28-IgI3 як можливі місця контакту з CEACAM1-N (рис. 2.3a) і провели тестування аланінових замін в цих та інших амінокислотах R28-IgI3 для оцінки їхньої важливості у взаємодії з CEACAM1-N за допомогою біохімічних аналізів. Суттєве зменшення зв'язування CEACAM1-N спостерігалось для Dynabeads, покритих R28-IgI3, мутованими в позиціях K45, I52, I53 та Y61 (рис. 2.3b). Ці результати були підтверджені аналізом ІТС. Далі ми перевірили, чи зміни в амінокислотах CEACAM1-N впливають на зв'язування з R28-IgI3 (рис. 2.3a,c). Мутації в амінокислотах F29, I91 або L95 CEACAM1-N призвели до припинення взаємодії з R28-IgI3 (рис. 2.3c), тоді як мутація амінокислоти Q89 зменшила зв'язування з R28-IgI3.

Крім того, мутація амінокислот V96 або N97 суттєво збільшила зв'язування CEACAM1-N з R28-IgI3. Аналіз ІТС підтвердив ці результати. Узявши разом нашу структурну та біохімічний аналіз, можна зробити висновок, що R28-IgI3 прилягає до сайту димеризації CEACAM1 cis/trans на грані A'GFCC'C'' (амінокислоти F29, Q89, I91 та L95), а унікальні структурні особливості R28-IgI3 надають сайт з високим електростатичним зарядом (K45 та Y61) і високою стабільністю (I52 та I53) для зв'язування з CEACAM1 (рис. 2.3d).

Наприкінці, ми дослідили наявність варіацій в послідовності R28-IgI3, які можуть впливати на здатність взаємодіяти з CEACAM1. Регіон R28-IgI3 був консервований в геномах тих, кого ми тестували на позитивність spr28 (рис. 2.1e), і аналіз BLAST проти всієї бази даних білків *S. pyogenes* NCBI підтвердив високий рівень консервації з єдиним варіантом валіну на аланін в амінокислоті під номером 26. Ця амінокислота не знаходиться в або близько до інтерфейсу зв'язування з CEACAM1, що свідчить про те, що всі білки R28 взаємодіють з CEACAM1.

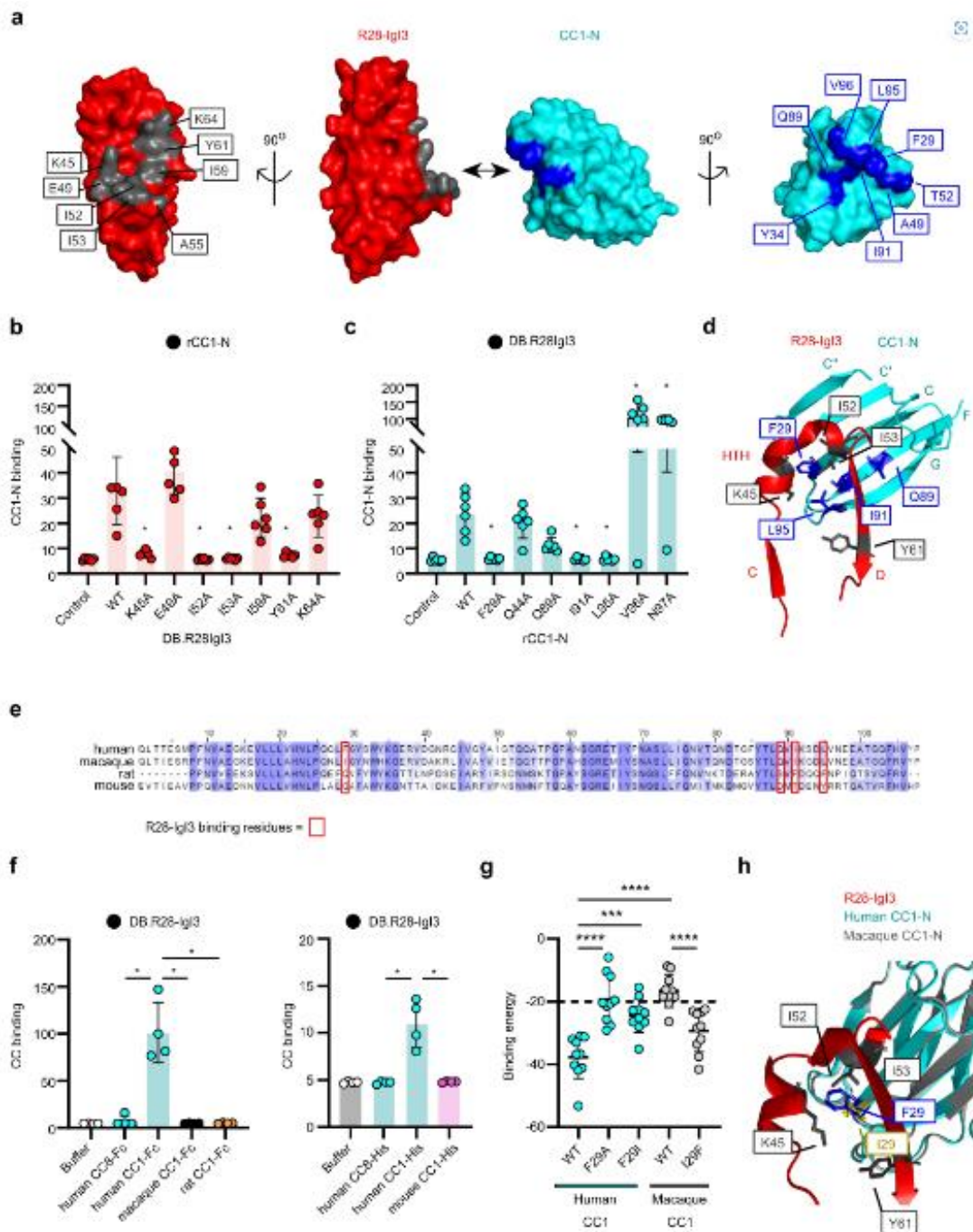


Рисунок 2.3 – Структурна основа та людська специфічність взаємодії R28-IgI3 з CEACAM1.

Оскільки R28-IgI3 зв'язується з інтерфейсом транс-димеризації (грань A'GFCC'C'') CEACAM-N, виникло питання, чи може зв'язування R28-IgI3 з CEACAM1 запобігти взаємодії транс-димеризації CEACAM1. Перекладення кристалографічного транс-димера CEACAM1 (PDB: 4WHD) з комплексом R28-IgI3 показує, що зв'язування R28-IgI3 є несумісним із транс-димеризацією

СЕАСАМ1. Також зв'язування інших бактеріальних лігандів є несумісним із транс-димеризацією СЕАСАМ1 [26]. Ці дані свідчать про те, що інфікування R28 + *S. pyogenes*, але не R28- *S. pyogenes*, може знизити ефективність перехресного зв'язування СЕАСАМ1.

R28 специфічно зв'язується з людським СЕАСАМ1.

Інфекції *S. pyogenes* є обмеженими людським організмом. Тим не менше, властивості вірулентності штамів *S. pyogenes*, які виражають R28, були вивчені на мишиних та нелюдських приматів (макак) моделях [9,25,27]. Таким чином, ми проаналізували характер специфічності до господаря взаємодії R28-СЕАСАМ1. Чотири критичні амінокислоти людського СЕАСАМ1 (F29, Q89, I91, L95), необхідні для докінгу R28-IgI3, не зберігаються в послідовностях СЕАСАМ1 макаки, миші та щура (рис. 2.3e), що свідчить про те, що взаємодія R28-СЕАСАМ1 обмежена до людини. Біохімічні аналізи показали, що R28-IgI3 зв'язується з людським СЕАСАМ1, але не з мишиним, щурячим чи макакійським СЕАСАМ1 (рис. 2.3f). Відповідно до цього, бактерії *S. pyogenes*, що виражають R28, не взаємодіяли з макакійським СЕАСАМ1 в молекулярних та клітинних аналізах.

Лише у однієї з чотирьох амінокислот, які виявилися критичними для взаємодії R28-IgI3 (амінокислота F29 в людському СЕАСАМ1), відмінності були виявлені між людським і макакійським СЕАСАМ1. Симульоване докування R28-IgI3 на структури домена СЕАСАМ1-N зі зміненими та незміненими амінокислотами правильно передбачило, що R28-IgI3 зв'язується з людським, але не макакійським СЕАСАМ1 (рис. 2.3g). Крім того, аналіз *in silico* також показав, що мутація F29I в людському СЕАСАМ1 суттєво зменшує енергію зв'язування R28-IgI3, тоді як мутація I29F в макакійському СЕАСАМ1 суттєво збільшує енергію зв'язування R28-IgI3 (рис. 2.3g). Отже, аналіз вказує на те, що амінокислота F29 в людському СЕАСАМ1 є критичним визначником людської специфічності, ймовірно, через взаємодію з амінокислотами K45 та I52 на R28-IgI3 (рис. 2.3h). Ці результати показують, що R28 специфічно зв'язується з людським СЕАСАМ1 і свідчать про те, що

результати експериментальних тваринних моделей, ймовірно, недооцінюють роль R28 у вірулентності *S. pyogenes*.

R28 ускладнює процес загоєння рани

Оскільки CEACAM1 виражений на епітелії жіночого репродуктивного тракту [18,28], ми перевірили гіпотезу, що R28 підвищує адгезію *S. pyogenes* до цих епітеліальних поверхонь через взаємодію з CEACAM1. Адгезія нашого контрольного штаму *S. pyogenes* AL368 до моношар ME-180, клітинної лінії людського походження шийки матки, яка виражає CEACAM1 [29], залежала від R289 і специфічно зменшувалася антитілом, що визнає N-домен CEACAM1 (рис. 2.4a). Аналогічні спостереження були зроблені для альтернативної ізогенної пари штамів *S. pyogenes*. Таким чином, R28 сприяє зв'язуванню *S. pyogenes* з клітинами шийки матки за рахунок взаємодії з CEACAM1. Подібні результати були отримані в аналізах, що вимірювали зв'язування *S. pyogenes*, позначеного флуоресцентними мітками, до відокремлених клітин ME-180.

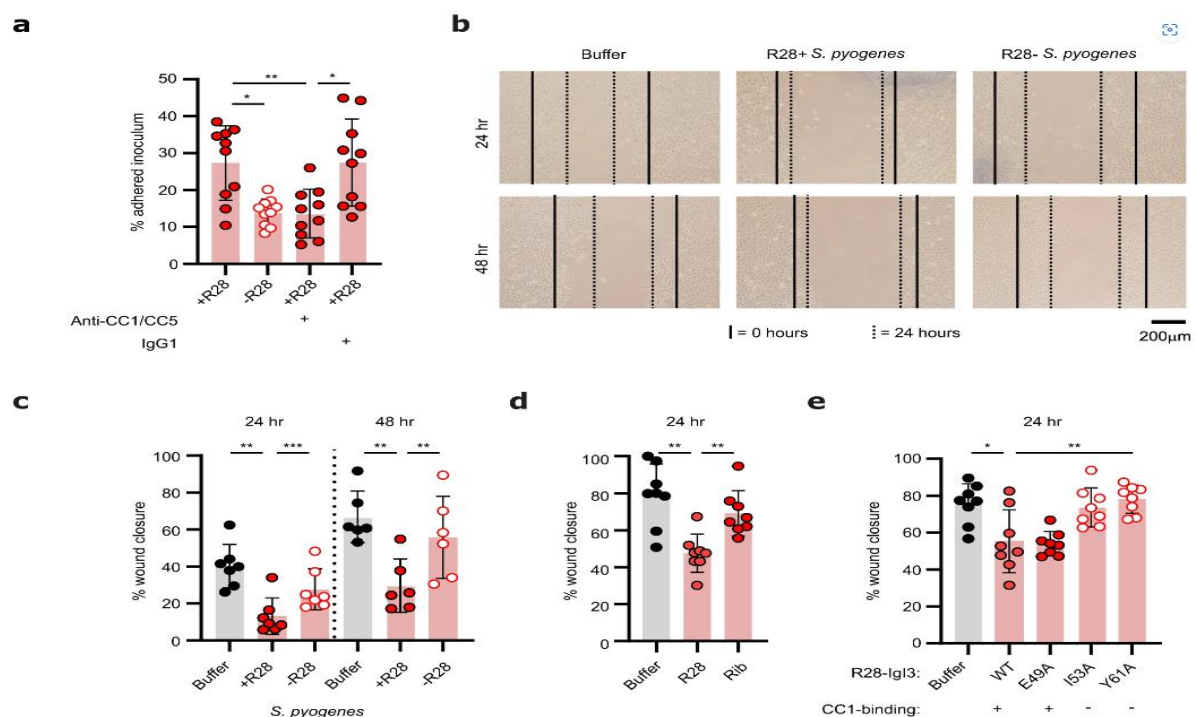


Рисунок 2.4 – R28 сприяє прилипанню *S. pyogenes* до епітеліальних клітин шийки матки людини та пригнічує закриття ран через CEACAM1-залежний механізм.

Отримані результати з клітинною лінією ME-180 підтвердили, що R28 взаємодіє з рецептором CEACAM1, який присутній на поверхні епітеліальних клітин шийки матки. Однак для виклику посляпологового сепсису *S. pyogenes* повинен потрапити в тканини жіночого репродуктивного тракту через рани, що виникають під час пологів, підсилити вроджену імунну відповідь та уникати вбивства імунними клітинами при потраплянні в кров. Ми припускали, що R28 бере участь в одному з цих процесів. Щоб проаналізувати внесок взаємодії R28-CEACAM1 у потрапляння *S. pyogenes* в тканини через рани, ми використовували ін вітро скретч-тест, який регулярно використовується для вивчення загоєння ран [30]. Незважаючи на те, що попередні результати свідчили, що CEACAM1 регулює міграцію клітин та загоєння ран [31-33], ніколи не ставалося пропозицій, що *S. pyogenes* (або R28) може впливати на цей процес. Порізи, нанесені на моношари клітин ME-180, заростали на 40,1% ($\pm 11,7$) через 24 години культури і на 66,8% ($\pm 14,0$) через 48 годин культури (рис. 2.4b,c), але загоєння рани суттєво гальмувалося після інфікування *S. pyogenes*, яке виражає R28, тоді як у R28-негативного мутанта це мало або жодної дії. Крім того, блокування доступу до N-домену CEACAM1 на клітинах ME-180 відновлювало загоєння рани під час інфікування *S. pyogenes*. Затримка загоєння рани також спостерігалася у R28-залежний спосіб при інфікуванні альтернативною ізогенною парою *S. pyogenes*. Щоб з'ясувати, чи достатньо взаємодії R28-CEACAM1 для виклику затримки загоєння рани відсутністю інших бактеріальних компонентів, ми вивчили здатність очищеного R28 затримувати загоєння рани. Затримка загоєння рани в моношарах клітин ME-180 відбувалася при інкубації з очищеним R28, але не з близьким за родоводом білком Rib з *S. agalactiae* (рис. 2.4d). Фенотип також викликався rR28-IgI3 (рис. 2.4e), що свідчить про те, що взаємодія з IgI3-доменом ME-180 клітин була достатньою для затримки загоєння рани. Щоб вивчити, чи rR28-IgI3-домен діє за допомогою механізму, залежного від CEACAM1, ми порівняли функціональні властивості варіантів rR28-IgI3, які зв'язуються чи не зв'язуються з CEACAM1 (як показано на рис.

2.3b). Важливо зауважити, що білки rR28-IgI3, які зв'язуються з CEACAM1 (rR28-IgI3 та rR28-IgI3E49A), затримували загоєння рани, в той час як rR28-IgI3Y61A, який не зв'язується з CEACAM1, не викликав затримки загоєння рани (рис. 2.4e). Хоча не спостерігалось значущої різниці в загоєнні рани між rR28-IgI3 та rR28-IgI3I53A, був присутній тренд. Загалом ці дані свідчать про те, що взаємодія між *S. pyogenes* та людським CEACAM1 через R28 сприяє адгезії до епітеліальних клітин і пригнічує загоєння рани.

R28 пригнічує вроджені відповіді імунної системи

Наступними захисними механізмами, які повинні подолати *S. pyogenes*, є вроджена імунна відповідь різноманітних імунних клітин, які проживають в епітелії та ламіна пропрії. Оскільки CEACAM1 є імуномодулюючим рецептором, який виражається на імунних клітинах і регулює антибактеріальні відповіді [19,20], ми припускали, що вираження R28 *S. pyogenes* призведе до порушення імунної відповіді тканин проти стрептококової інфекції.

Щоб перевірити це, ми оцінили профіль цитокінів та хемокінів моношарів клітин ME-180 та лежачих під ними людських периферійних крові мононуклеарних клітин за допомогою трансвель культурних камер. Неподільні штами *S. pyogenes* були додані до апікальної камери, і взаємодія дозволялася розвиватися протягом 72 годин перед аналізом вироблення цитокінів та хемокінів. Імунна відповідь проти дикого типу *S. pyogenes* була порушена порівняно з імунною відповіддю на ізогенний штаму R28-негативний. Зокрема, спостерігалось значуще зменшення або тенденція до зменшення вироблення протизапальних цитокінів та хемокінів, таких як IL-1 β , TNF- α , GM-CSF, IFN- γ , RANTES, IL-6 та MCP-2. Для подальшого вивчення імуномодулюючого впливу R28 в більш фізіологічно релевантному середовищі ми використали експлантати тканини шийки матки людини [34], які представляють цінну модель для вивчення імунної відповіді клітин імунної системи. Експлантати тканини шийки матки людини інфікували штамами *S. pyogenes* дикого типу або ізогенними штамами з відсутністю R28 протягом 24 годин, а потім культивували в присутності антибіотиків для знищення

позаклітинних бактерій протягом 24 годин (рис. 2.5a). Відзначимо, що не спостерігалось токсичності в інфікованих тканинах *S. pyogenes*. Узяті разом, ці експерименти свідчать про те, що вираження R28 *S. pyogenes* асоційоване із порушенням вродженої імунної відповіді.

Нейтрофіли - це вроджені клітини імунітету, які забезпечують перший бар'єр проти вторгнення бактерій у крові, здійснюючи фагоцитоз та/або вивільнення антимікробних факторів. Однак *S. pyogenes* обладнаний кількома факторами віруленції на поверхні, такими як M-білки [35,36], які пригнічують фагоцитоз та убивання, спровоковані нейтрофілами. Оскільки CEACAM1 виражається людськими нейтрофілами після активації [18], ми досліджували, чи може R28 стати ще одним механізмом для *S. pyogenes* подолання захисних механізмів людини, збільшуючи стійкість до убивання нейтрофілами. Очищений R28 зв'язувався з поверхнею активованих людських нейтрофілів, але не з відпочиваючими нейтрофілами (рис. 2.5c). Слід відзначити, що R28 не взаємодіє з іншими рецепторами CEACAM, що виражені на нейтрофілах (рис. 2.2c,d,e), включаючи фагоцитичний рецептор CEACAM3 receptor [37,38]. Це свідчить про те, що R28, виражений на *S. pyogenes*, буде зв'язуватися з активованими нейтрофілами виключно через CEACAM1. Далі ми оцінили, чи сприяють взаємодії R28-CEACAM1 збільшенню стійкості *S. pyogenes* до убивання нейтрофілами, кількісно визначаючи виживання *S. pyogenes* після інкубації з людськими нейтрофілами протягом 1 і 2 годин. Згідно з попередніми відомостями, експресія R28 підвищує стійкість *S. pyogenes* до убивання нейтрофілами (рис. 2.5d). Ці спостереження були підтверджені експериментами з вбивством в цілій крові (рис. 2.5e), де експресія R28 підвищує стійкість *S. pyogenes* до убивання. Більше того, збільшене виживання *S. pyogenes* з експресією R28 в цілій крові залежало від здатності взаємодіяти з CEACAM1 (рис. 2.5f), оскільки спостерігалось зменшення виживання, коли бактерії перед експериментом обробляли рекомбінантним CEACAM1. Загалом ці дані свідчать про те, що стійкість *S. pyogenes* до

вбивання клітинами вродженого імунітету підвищується завдяки зв'язуванню R28 з CEACAM1.

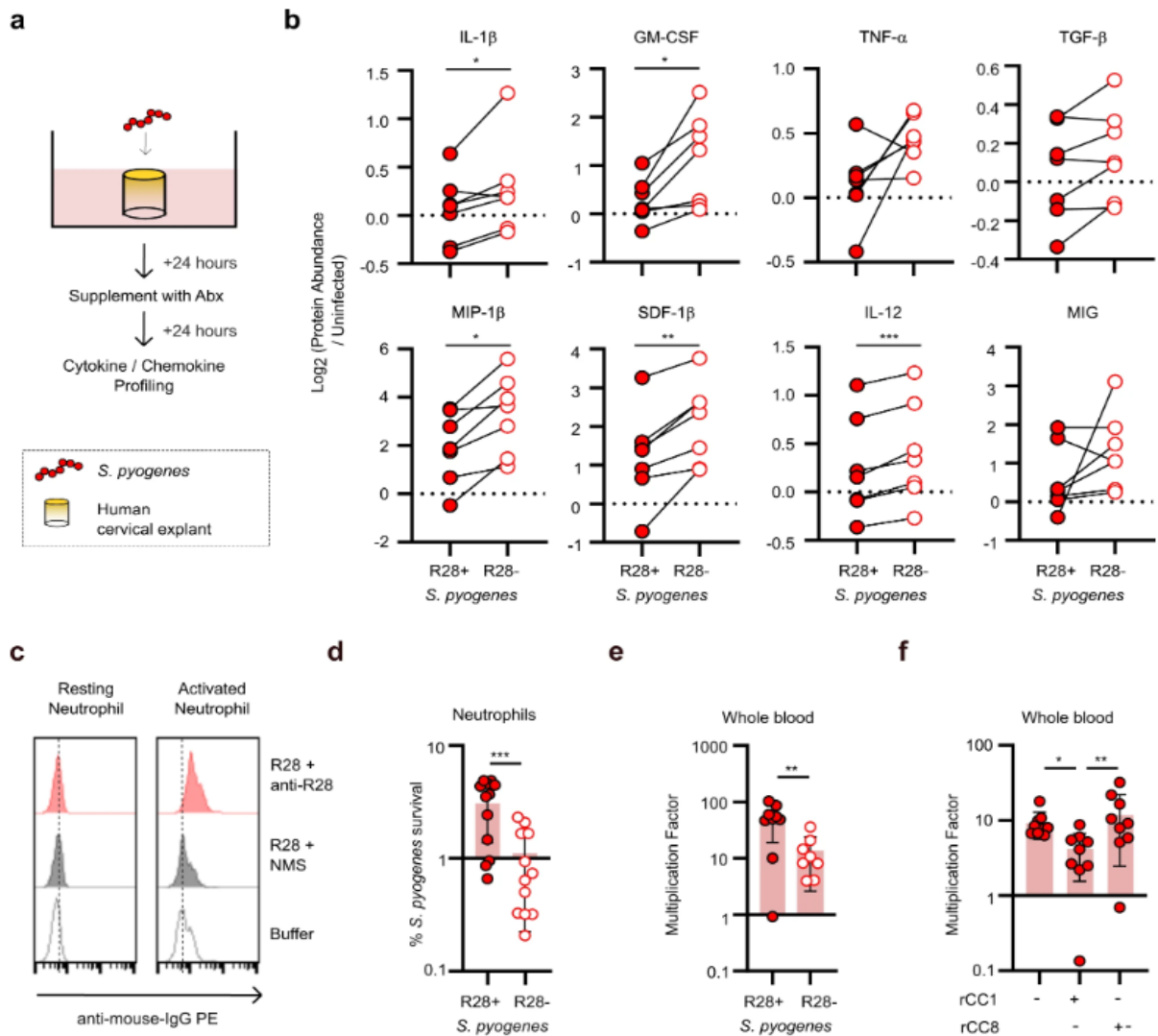


Рисунок 2.5 – *S. pyogenes* порушує імунну відповідь людини через взаємодію R28-CEACAM1.

Пуерперальний сепсис - це захворювання з важливим історичним контекстом, що визначає розвиток теорії збудників і сучасного контролю за інфекцією [4,5]. Ми зараз розкрили роль адгезину R28 в патогенезі пуерперального сепсису, викликаного *S. pyogenes*, на молекулярному та функціональному рівні. Наші результати демонструють, що людський CEACAM1 є високоспецифічним рецептором для R28. Ця єдина взаємодія між хазяїном та патогеном сприяє адгезії бактерій до епітеліальних шарів, затримує заживлення епітелію, перекриває вроджені відповіді імунітету та

підвищує стійкість *S. pyogenes* до вбивання за допомогою імунітету. Отже, наші дослідження показують, що один бактеріальний фактор може спрямовувати один хазяїнський фактор для допомоги бактеріальному патогену подолати кілька хазяїнських бар'єрів на шляху до виникнення інвазивного захворювання. Це відмінно від встановленої точки зору, що окремі молекулярні взаємодії хазяїн-патоген головним чином допомагають бактеріальному патогену подолати один механізм захисту хазяїна. Цей висновок підкреслює важливість розглядання того, що окремі молекулярні взаємодії хазяїн-патоген можуть мати багатогранні функції у патогенезі бактерій.

Спрямування *S. pyogenes* до CEACAM1 на епітеліальних клітинах і клітинах імунітету, ймовірно, сприяє тканинній інвазії бактерій, виживанню в крові та розвитку системної інфекції, як це підсумовано на рис. 6. Ця модель гармонійно відповідає даним, отриманим для інших бактеріальних патогенів, які зв'язуються з CEACAM1 і використовують його роль як імуномодуючого рецептора [19,22,39], зокрема *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Helicobacter pylori*, *Moraxella catarrhalis*, *Fusobacterium nucleatum* та *Haemophilus influenzae*. В той час як наші дані свідчать про те, що R28 відіграє ключову роль у патогенезі пuerперального сепсису, додаткові вірулентні фактори *S. pyogenes*, такі як M-білки, екзотоксини та протеази, ймовірно, є вторинними детермінантами, необхідними для виникнення цього інвазивного захворювання [40,41].

Адгезин R28 взаємодіє виключно з CEACAM1. На відміну від цього, інші бактеріальні адгезини взаємодіють з комбінацією CEACAM1, CEACAM3, CEACAM5 та CEACAM6 [17,42,43,44,45,46]. Наше відкриття робить *S. pyogenes* першим патогеном, для якого зв'язок з CEACAM обмежений CEACAM1. Основа цієї вибіркості потребує додаткового дослідження і не може бути пояснена спрямуванням R28 на різні обличчя CEACAM, оскільки R28 та всі дотепер характеризовані бактеріальні ліганди зв'язуються з обличчям A'GFCC'C'' [17,42,43,44,45]. Більше того, цю

вибірковість не можна повністю пояснити різним спрямуванням залишків в обличчі A'GFCC'C" CEACAM1, оскільки залишки F29, Q89, I91 та L95 на CEACAM1 впливають на R28 та інші бактеріальні адгезини, включаючи β -білок *S. agalactiae*, HopQ *H. pylori* та Ора *Neisseria* spp [17,42,44,45]. Унікальний режим зв'язування R28, який вибірково спрямований на CEACAM1, потребує дослідження за допомогою формальних біофізичних оцінок.

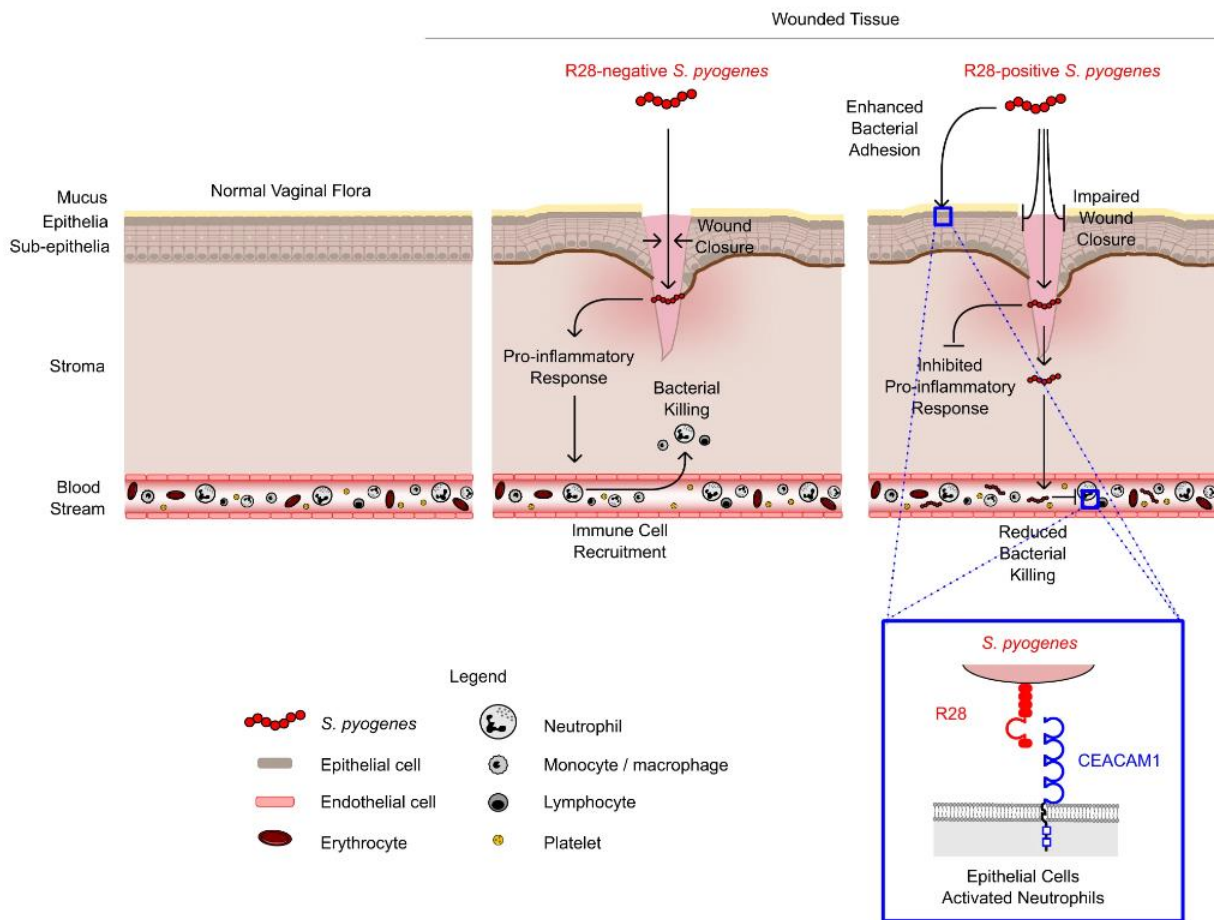


Рисунок 2.6 – Модель взаємодії R28-CEACAM1 у патогенезі післяпологового сепсису *S. pyogenes*.

Для *S. pyogenes* зв'язування R28 з CEACAM1 також надає механізм для затримки загоєння ран на епітеліальних шарах. Ці властивості R28 повинні бути важливими в тканинах, пошкоджених у жінок після пологів, оскільки затримка загоєння рани продовжить час для того, щоб патоген міг вторгнутися в тканини і викликати пuerперальний сепсис. Властивості R28 також

привертають увагу до слабо вивчених механізмів, які відомі за участю CEACAM1 у регулюванні міграції клітин та загоєнні ран [31-33]. Зазначимо, що взаємодія між R28 та CEACAM1 відрізняється від тієї, що виявлена у інших бактеріальних патогенах, які зв'язуються з CEACAM1 і використовують його для спричинення ендоцитозу бактерій в епітеліальні клітини, де вони можуть реплікуватися і/або трансцитоз епітеліального шару [47-49].

S. pyogenes розвинув високорозвинені механізми для ухилення фагоцитозу та вбивання нейтрофілів [50]. Активовані нейтрофіли виражають не тільки CEACAM1, але і CEACAM3 - спеціалізований рецептор для фагоцитозу та усунення бактерій, що зв'язуються з CEACAM3 [37,38]. Оскільки R28 не взаємодіє з CEACAM3, наші дані свідчать, що CEACAM3 не впливає на роль R28 у патогенезі інфекцій *S. pyogenes* та пuerперального сепсису. Ця відсутність взаємодії з CEACAM3 відрізняється від більшості інших бактеріальних лігандів CEACAM, включаючи *Opa Neisseria spp.* [44,45], *PorQ H. Pylori* [42] та *UspA1 M. Catarrhalis* [43,51]. Висока специфічність для CEACAM1 свідчить, що R28 розвинувся для ухилення від виявлення нейтрофілами через CEACAM3, зберігаючи здатність взаємодіяти з CEACAM1. Це може дозволити *S. pyogenes* ухилятися від протибактеріальних відповідей нейтрофілів. Краще розуміння подій внутрішньоклітинного сигнального шляху, які впливають на R28 взаємодію з CEACAM1 на нейтрофілах, може допомогти розуміти розвиток інвазивних інфекцій та пuerперального сепсису.

Оскільки недавнє дослідження повідомило, що людські інтегрини можуть виступати як рецептори для обох доменів N1 і N2 R28 [21], існує можливість, що інтегрини служать як співрецептори для R28. Однак наші експерименти *in vitro* та *ex vivo* показують, що взаємодія з CEACAM1 є необхідною і достатньою для того, щоб R28 пригнічував заживлення ран, вроджену імунну відповідь та вбивання нейтрофілами. Тому ми припускаємо, що взаємодії R28-інтегрин мають низьку афінність та можуть бути непотрібними для функціональних властивостей R28. Також взаємодії з

інтегрини можуть бути непотрібними для вірулентності *H. pylori*, яка взаємодіє з CEACAM1 за допомогою адгезину HopQ для сприяння вірулентності [22,52]. Важливо відзначити, що ідентифікація людського CEACAM1 як специфічного рецептора для R28 надає критичну інформацію про те, що для повного розкриття ролі R28 *in vivo* необхідні гуманізовані моделі тварин [53], та що експерименти з інфікуванням wildtype мишей або макак з штамами R28 мають бути оцінені з обережністю [9,25,27].

Хоча R28 виявляється в штаммах *S. pyogenes* різних типів emm, зокрема emm28, emm2, emm48 і emm77, лише штамми emm28 мають сильний зв'язок з вибухами пuerперального сепсису [10-12]. Однак повідомлялося, що штамми emm77 спричинили принаймні один випадок [54]. Існують кілька потенційних пояснень для асоціації штамів emm28 з вибухами пuerперального сепсису. По-перше, це може бути через те, що штамми emm28 поширеніше, ніж штамми emm2, emm77 і emm48, як це вказується останніми даними про розподіл типів emm [13,55]. По-друге, це може бути через те, що ген R28, spr28, присутній у всіх штаммах emm28, але не у всіх штаммах emm2, emm77 і emm48 [13,23], факт, який можна віднести до досить недавнього здобуття мобільного генетичного елемента, що несе spr28, у цих лініях [24]. В-третьє, наші дані вказують, що експресія R28 вища у штаммах emm28 порівняно зі штаммами emm2 та emm77. Зрештою, можливо, що штамми emm28 мають підвищену передачу або властивості вірулентності. Деякі чи всі ці фактори можуть сприяти переважанню emm28 серед штамів, які викликають вибухи пuerперального сепсису. Важливо також відзначити, що випадки пuerперального сепсису, що виникають рідко, часто викликані штамми *S. pyogenes*, які не виражають R28 [11]. Це може статися, якщо такі штамми обходять початкові бар'єри до інфекції, хоча вони не мають R28, в такому випадку хвороба може бути схожою на ту, яку викликають штамми *S. pyogenes*, які мають R28. Однак здається розумним припускати, що для штамів, які мають R28, потрібна менша доза інфекції, що може сприяти виникненню вибухів.

Найбільш відповідний експеримент для перевірки здатності взаємодії R28-CEACAM1 сприяти розвитку пуерперального сепсису - це вивчення перебігу захворювання у самок мишей, включаючи трансгенні жіночі миші CEACAM1^{+/-} або ^{+/+}, після вагінального інокуляції *S. pyogenes* невдовзі після народження молодняка. Однак така модель, яка слідує природному шляху пуерперального сепсису, не існує. З урахуванням великої втрати молодняка та використання самок, які тільки що народили молодняка, вельми мало ймовірно, що дозвол на проведення таких експериментів надав би етичний комітет. Крім того, дослідження колонізації в трансгенних мишах, відсутність ушкоджень, зумовлених пологам, погано обгрунтовані, оскільки *S. pyogenes* рідко колонізує репродуктивний тракт жінок, навіть на пізній вагітності [56]. Ці аргументи підкреслюють необхідність розробки нових моделей, які повинні бути гуманізованими з урахуванням людської специфіки взаємодії R28-CEACAM1, для вивчення пуерперального сепсису.

Наші результати надають важливі докази того, що взаємодія R28-CEACAM1 відіграє ключову роль в вибухах пуерперального сепсису, спричиненого *S. Pyogenes*; розширюють розуміння одного з найважливіших нозокоміальних інфекцій в історії людства. Оскільки R28 викликає захисний імунітет, він може стати предметом інтересу для включення його в майбутню вакцину від *S. pyogenes*. Цей аспект особливо важливий через те, що R28 кодується на мобільному генетичному елементі, що викликає обурення щодо поширення гену в нові лінії *S. pyogenes* або інші види бактерій. Нарешті, наша робота підкреслює, що поєднання епідеміології з функціональним аналізом факторів вірулентності, пов'язаних із захворюванням, може бути вирішальним для розкриття молекулярних основ важливих бактеріальних інфекцій.

3 ОСОБЛИВОСТІ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЇ ВІЗУАЛІЗАЦІЇ ЗЛОЯКІСНИХ ПУХЛИН

Арсенал інструментів та допоміжних технологій сучасної хірургії розширюється прискореними темпами. Останні кілька десятиліть серед таких «інструментів» візуалізації виникла магнітно-резонансна томографія, комп'ютерна томографія, позитронно-емісійна томографія та інші методи. Вищезазначені методи та їх широке використання в плановій діагностиці значно покращило статистику раннього виявлення раку та отримання негативних країв резекції пухлини без необхідності повторного операційного втручання [1,2,3]. Проте, забезпечення вільного від пухлини краю резекції під час операції є проблемою у клінічній онкології.

Інтраопераційний аналіз заморожених зрізів широко використовується для визначення країв пухлини під час резекції, проте цей метод займає багато часу (до 20 хвилин, якщо все йде добре) і потребує добре навченого персоналу. Іноді патологоанатому необхідно вивчення профільної літератури про передбачувану пухлину, можливі гістологічні варіанти та класифікацію [4, 5]. Навіть при злагодженій роботі хірурга та патологоанатома цей метод не варто розглядати як повну заміну парафінізації зразків. Метод заморожених зрізів має безліч обмежень порівняно зі зрізами тканин, залитих парафіном через можливу незадовільну якість отриманих зрізів і недостатнє фарбування тканин. У роботі [6] вивчалися точність та особливості діагностики заморожених зрізів первинних пухлин яєчників та метастазів у яєчники. З 802 первинних пухлин яєчників у 50 (6,2%) випадках були виявлені суперечливі діагнози, при яких муцинозна карцинома (40,5%), серозна карцинома низького ступеня злоякісності (LGSC; 31,3%) та муцинозна прикордонна пухлина 4%) часто інтерпретувалися неправильно. З 69 метастазів у яєчники всі 4 випадки апендикулярного муцинозного новоутворення низького ступеня злоякісності (LAMN) були помилково діагностовані як первинна муцинозна пухлина яєчників. Це дослідження виявило гістологічні типи як первинних пухлин

яєчників, так і метастазів у яєчники вiд iнших видiв раку, схильних до помилкової дiагностики при iнтраоперацiйнiй дiагностицi заморожених зрiзiв.

Серед iнших методiв дiагностики для досягнення негативних країв резекцiї можна видiлити вiзуальний огляд i пальпацiю. Остання унеможливує виявляти невеликi пухлини. Пальпацiя має обмежену чутливiсть i все частiше не використовується через збiльшення використання роботизованої лапароскопiчної хiрургiї. Порiвняно новою тенденцiєю є використання флуоресцентної iнтероперацiйної вiзуалiзацiї, яка є безконтактною, вiдносно дешевою i неiонiзуючою технiкою навігацiї, яка активно впроваджується в хiрургiчну практику [7, 8]. Для початку давайте коротко нагадаємо, що таке явище флуоресценцiї та на яких фiзичних принципах воно ґрунтується. Вперше флуоресценцiю сполук хiмiну спостерiгав фiзик Джордж Стокс у 1852 році. Флуоресценцiя - це випромiнювання свiтла речовиною, яка поглинула свiтло або iнше електромагнiтне випромiнювання. Згiдно з уявленнями квантової хiмiї, електрони в атомах розташованi на енергетичних рiвнях. Рiзниця енергiї мiж енергетичними рiвнями та частота коливань поглиненого свiтла спiввiдносяться мiж собою рiвнянням:

$$E_2 - E_1 = h\nu \quad (1)$$

Пiсля поглинання свiтла частина отриманої системи енергiї витрачається в результатi релаксацiї. Частина ж може бути випущена у виглядi фотона певної енергiї (рис. 3.1). Коли свiтлова енергiя поглинається органiчними молекулами флуорохрому, відбувається просування делокалiзованих електронiв з основного стану на вищий енергетичний рiвень. Пiсля повернення зi збудженого синглетного стану в основний стан випромiнюється енергiя у формi фотонiв, якi досягають ока спостереження у виглядi флуоресценцiї. Синглетний стан зазвичай вiдноситься до системи, в якiй усi електрони спаренi. Термiн «синглет» означає пов'язаний набiр частинок, чий сумарний кутовий момент дорiвнює нулю, тобто чие загальне

спінове квантове число $s=0$. Фотони флуоресценції мають нижчу енергію $h\nu_{em}$ порівняно з енергією фотонів, які використовуються для генерації збудженого стану $h\nu_{ex}$. Збуджений стан S_1 може релаксувати за допомогою інших механізмів, які не включають випромінювання світла. Ці процеси, які називаються безвипромінювальними, конкурують із флуоресцентним випромінюванням і знижують його ефективність. Внутрішня конверсія пояснює частину поглиненої енергії, яка не була перетворена на флуоресцентне випромінювання.

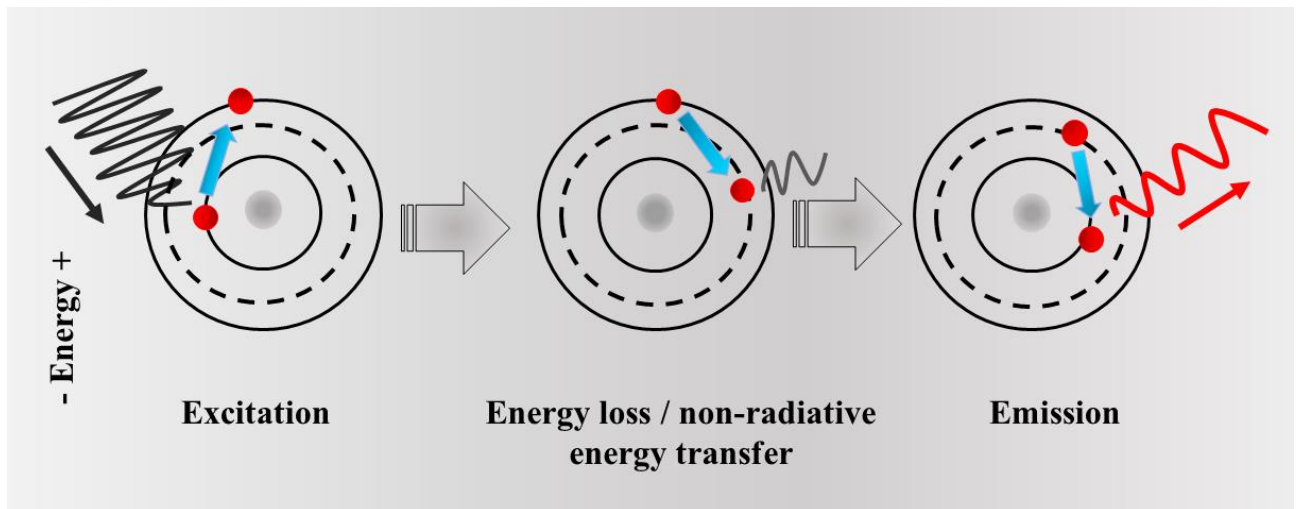


Рисунок 3.1 – Схематичний рисунок, що демонструє принцип флуоресценції.

Однак, при ознайомленні з актуальними технологіями флуоресцентної хірургії ми оперуватимемо такими величинами як довжина хвилі збудження та флуоресценції. Спектр флуоресценції зрушений щодо спектру поглинання у бік довгих хвиль. Це явище отримало назву «Стоксів зсув». Його причиною є безвипромінювальні релаксаційні процеси. В результаті частина енергії поглиненого фотона втрачається, а фотон, що випускається, має меншу енергію, і, відповідно, більшу довжину хвилі [9, 10, 11]. На рис. 3.2 показаний спектр електромагнітного випромінювання з детальним описом видимого та інфрачервоного діапазону.

Хоча у літературі описані випадки комбінування антитіл мічених як радіонуклідом, так і флуорофором [12]. Оскільки наш огляд зосереджений на неіонізуючій навігації, ми хотіли б коротко ознайомити читача з досягненнями

в оптимізації мічених антитіл радіонуклідом (т.зв. радіоактивною міткою) та подвійною міткою. Подвійне маркування пухлинного ураження дозволяє отримати високе співвідношення сигналу пухлина/фон [13]. Хоча чутливість є відносно високою (в діапазоні від 10^{-9} до 10^{-12} М), дози флуоресцентних агентів, необхідні для візуалізації, значно більші, ніж ті, що використовуються для ядерної візуалізації.

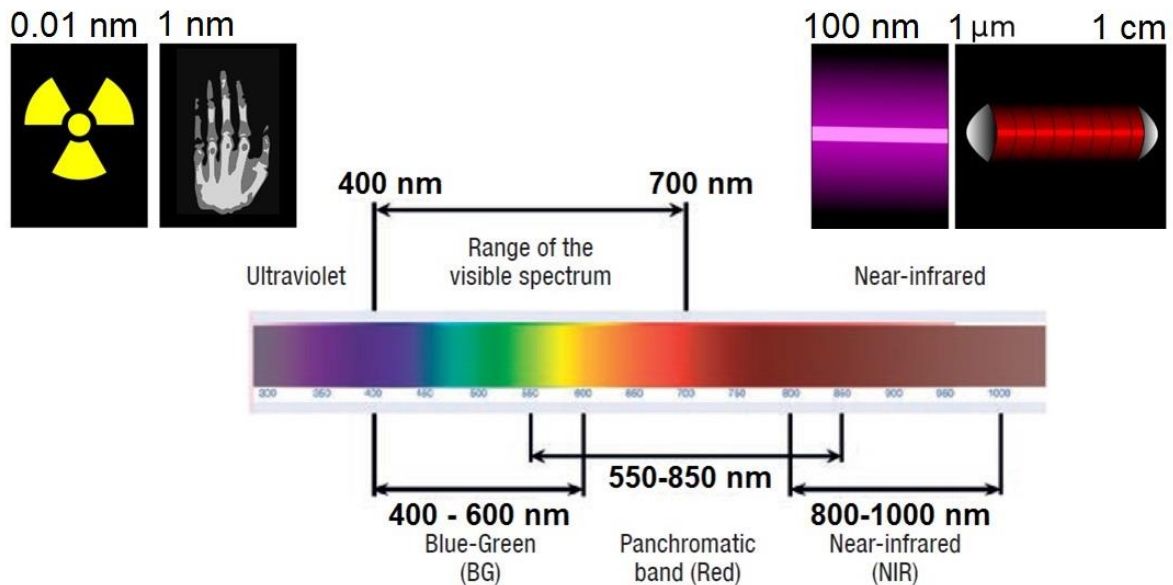


Рисунок 3.2 – Електромагнітний спектр з докладним описом видимого та інфрачервоного діапазону

3.1 Інтеропераційна візуалізація новоутворень комбінацією радіоактивної мітки та флуоресцентного сигналу

Для картування сторожових лімфатичних вузлів може бути достатньо перитуморальної ін'єкції барвників радіоізотопів або наноколоїдів у разі дисекції лімфатичних вузлів [14,15]. Однак для оцінки меж пухлини антитіла здаються особливо підходящими, оскільки вони специфічно накопичуються в пухлинній тканині і можуть бути кон'юговані з сигнальними молекулами, що представляють інтерес. Автори [16] використовували гамма-зонд для реєстрації антитіла, пов'язаних з різними радіонуклідами. Однак радіологія за допомогою гамма-зонда не забезпечує точного визначення меж пухлини та

країв резекції. Подвійна мітка з флуоресцентною візуалізацією дозволяє подолати обмеження двох окремих методів, проте варто пам'ятати, що глибина проникнення світла, що випромінюється, в біологічні тканини обмежена кількома міліметрами [17]. Тому авторами було виконано синтез антитіл з подвійною міткою: кон'югація флуорофору з антитілами. Для цих цілей використовували IRDye 800CW-NHS та ^{111}In був придбаний у Mallinckrodt (Petten, Нідерланди). Естер 800CW NHS (еквівалент IRDye 800CW NHS) — це флуоресцентний барвник із високою водорозчинною здатністю в ближньому інфрачервоному діапазоні, його можна безпосередньо позначити на біомолекулах, таких як первинне антитіло, вторинне антитіло тощо. Співвідношення заміни барвника на антитіло визначалося за допомогою вимірювання абсорбції при 280 і 774 нм з 3% корекцією через поглинання IRDye 800CW при 280 нм (згідно з протоколом виробника) за допомогою спектрофотометра Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech, Amersham, UK). Флуоресцентні зображення тварин отримували на довжині хвилі збудження 745 нм, використовувався набір індоціанінових зелених фільтрів (810-885 нм). Лабораторних мишей сканували протягом 1-5 хвилин. На рис. 3.3 показані зображення SPECT/CT мишей із пухлиною SK-RC-52 на правому боці після ін'єкції подвійно міченого гірентуксимабу. З рисунка ми бачимо важливість відношення барвника до антитіла для антитіл з подвійною міткою, що визначає візуалізацію меж *in vivo* [18]. При співвідношенні 2 або вище, накопичення антитіл з подвійною міткою в печінці збільшується, тоді як поглинання пухлиною знижується.

Візуалізація за допомогою антитіл, мічених тільки радіонуклідом, не може бути повною альтернативою флуоресцентної візуалізації в інтеропераційній діагностиці. Клінічне застосування направленої флуоресцентної візуалізації у пацієнтів з раком яєчників [19] з використанням флуоресцентного агента, націленого на рецептор фолієвої кислоти α , підтверджує широкі перспективи застосування антитіл з подвійною міткою для маркування пухлинного ураження.

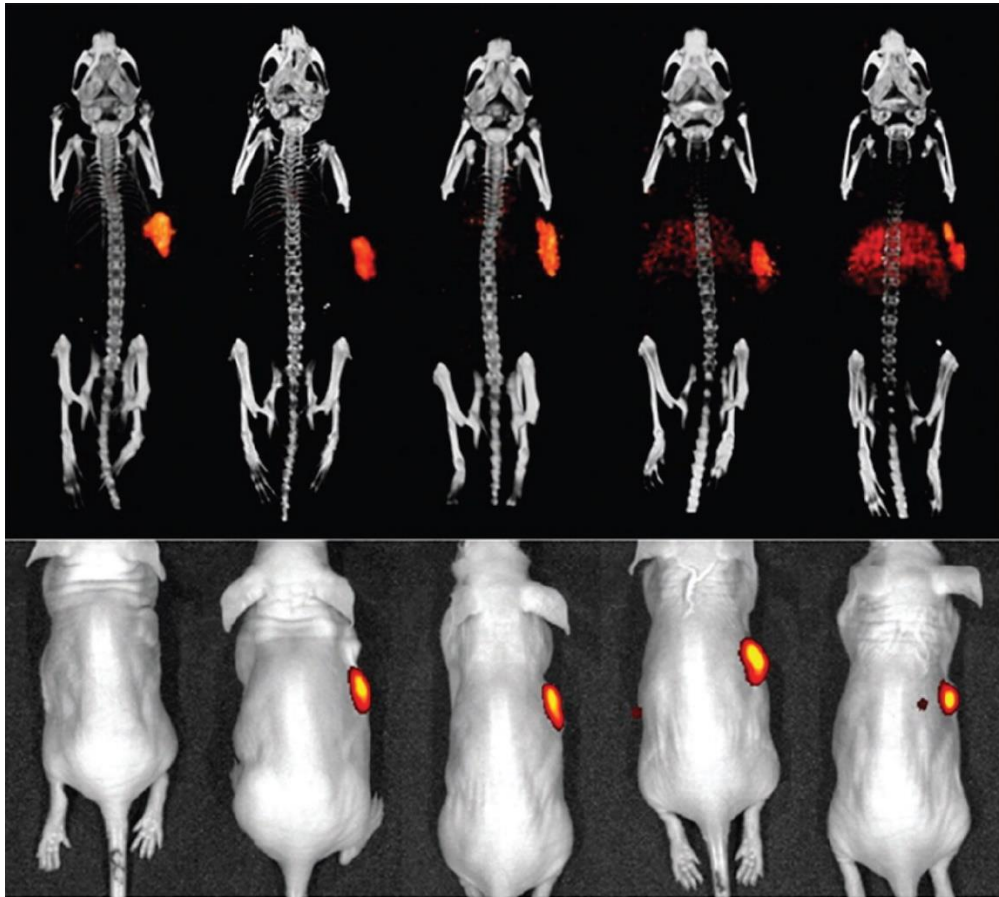


Рисунок 3.3 – SPECT - зображення (вгорі) та флуоресцентні зображення (внизу) мишей із пухлинами SK-RC-52 на правому боці через 48 годин після ін'єкції ^{111}In -DTPA-girentuximab-IRdye 800CW із співвідношенням заміни барвника до антитіла 0,1 , 1,5, 2 і 3 (зліва направо) [18].

3.2 Клінічно доступні методи флуоресцентної візуалізації

В даний час більшість зображень для інтепераційної навігації отримані за допомогою системи Novadaq SPY (схвалено FDA в 2005 році). Novadaq Spy здатна відображати флуоресцентну контрастну речовину, що випромінює світло з довжиною хвилі 830 нм при проходженні через судинне русло або камери міокарда. Проходження контрастної речовини можна спостерігати в реальному часі. Ринок систем флуоресцентної онкологічної хірургії розширюється з кожним роком. На рис. 3.4 показано кілька нових систем

флуоресцентної візуалізації схвалених FDA, а також добірка робочих параметрів.

Зосередимося на деяких технічних параметрах представлених систем на ринку. Ми вважаємо, що така інформація буде корисна особливо біоінженерам, які відповідають за комплектування та модернізацію медичних центрів.

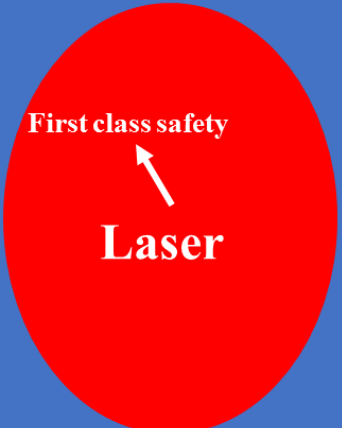

Imaging system	Excitation wavelength(s) nm	Light Source
NOVADAQ SPY (Novadaq technologies)	850	
FLUOBEAM (Fluoptics Company)	750 (800)	
FLUOBEAM SYSTEMS (Fluoptics Minatec)	680 (750)	
QUEST SPECTRUM (QUEST Medical Imaging)	400 – 1,000	
VS3 Iridium system (VisionSense)	805 (emission band 825 - 850)	
LIGHTVISION (Shimadzu Corporation)	700 – 800	
IMAGE1 S™ Rubina (Karl Storz)	700 – 800	
PDE-NEO II (Hamamtsu Photonics)	760	

Рисунок 3.4 – Клінічно доступні системи флуоресцентної візуалізації та їх деякі характеристики

The VS3 – Visionsense Stereoscopic High Definition (3DHD) Vision System усуває обмеження традиційних ендоскопічних систем, надаючи лікареві здатність точно оцінювати глибину, об'єм чи відстань. У порівнянні з традиційними ендоскопічними процесами VS3 система включає в себе підтримку для Infrared (IR) Fluorescence visualization. Система VS3 знаходиться на висоті від 20 до 40 см над пацієнтом під час хірургічної процедури. Модулі VS3 Iridium призначені для роботи з ІЧ-флуоресцентними барвниками: індоціаніновим зеленим або ICG. Збудливе випромінювання спрямоване на хірургічне поле для збудження молекул барвника і надалі

уловлюється за допомогою ІЧ-камери [20]. Система дозволяє захоплювати зображення у білому світлі паралельно з флуоресцентним ІЧ-зображенням та відображати обидва зображення для хірурга, щоб забезпечити кращу картинку для хірурга.

Використання нової флуоресцентної навігаційної системи LIGHTVISION з використанням зеленого індоціаніну для біопсії сторожового лімфатичного вузла у пацієнтів з раком шкіри описано в роботі [21]. LIGHTVISION — це пристрій, який складається з камери ближнього інфрачервоного діапазону (NIR) з телескопічною рукою та монітора високої роздільної здатності. Камера NIR оснащена світлодіодом (780-800 нм) і джерелами білого світла; він також має NIR та оптичні датчики зображення. Зазвичай біопсію сторожового лімфатичного вузла (SLNB) виконують двома методами: ін'єкцією синього барвника (метод барвника) та ін'єкцією радіоізотопного (RI) колоїду (метод RI). Нова методика лімфатичної навігації включала флуоресцентну візуалізацію індоціаніну зеленого (ICG) в комбінації з іншими методами. Трьом пацієнтам було проведено лімфосцинтиграфію шляхом внутрішньошкірної ін'єкції колоїду технецію-99-олова навколо первинної пухлини за день до операції. Один пацієнт не отримував ін'єкції радіоізотопного колоїду [22]. На рис. 3.5 після розрізання шкіри над виділеною ділянкою видно вузли, позначені синім кольором; радіоактивні вузли з накопиченням RI, що перевищує десятку частину максимального значення, що визначається інтраопераційним гамма-зондом; та ICG-флуоресцюючі вузли [23-24]. Загалом було виявлено та видалено дев'ять SLNs. Сім радіоактивних вузлів було виявлено за допомогою передопераційної лімфосцинтиграфії та інтраопераційного гамма-зондування, тоді як два радіоактивні вузли були визнані негативними за допомогою методу барвника. І навпаки, всі радіоактивні вузли показали флуоресценцію ICG. Один ICG-флуоресцентний SLN був негативним на основі методу фарбування та не показав радіоактивності (аксиллярний вузол).

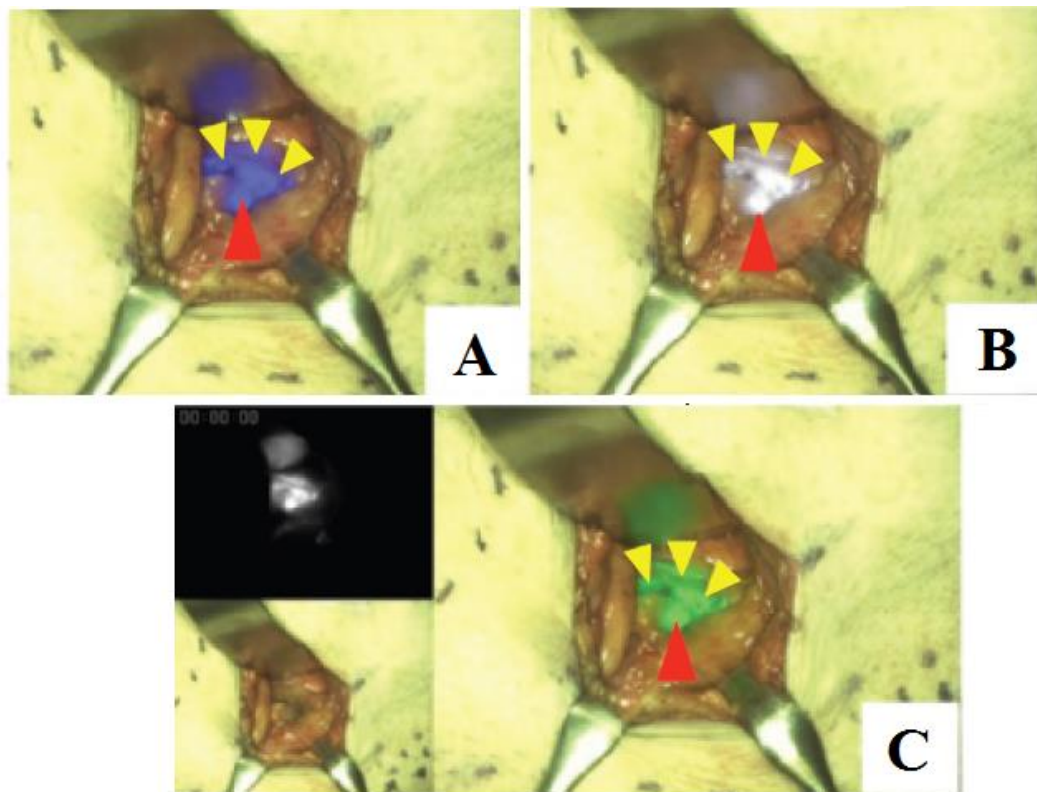


Рисунок 3.5 – Інтраопераційне використання LIGHTVISION для виявлення дозорних вузлів. С) Флуоресцентне зображення в ближньому інфрачервоному діапазоні, видиме зображення та флуоресцентне зображення у видимому + інфрачервоному діапазоні (права панель); червона стрілка: флуоресцентна зовнішня клубова SLN; жовті наконечники стрілок: поодинокі та агреговані лімфатичні судини + D, E. Флуоресцентні тазові SLN (червоні наконечники стрілок) і лімфатичні судини (жовті наконечники стрілок) відображаються синім (D) і білим (E).

ICG зв'язується з альбуміном і генерує пікову довжину хвилі 840 нм NIR флуоресценції при збудженні світлом 765 нм. Використовуючи NIR-камеру під час операції, ICG, введений навколо первинної пухлини, можна спостерігати в підшкірному лімфатичному потоці та SLN на флуоресцентному зображенні. Метод ICG особливо корисний, коли SLN не можна виявити за допомогою методу барвника.

Перемикаючи колір флуоресцентного зображення, хірурги можуть легко відрізнити лімфатичні судини та вузли навколишніх тканин. Автори

повідомляють, що на білому зображенні легше ідентифікувати лімфатичні підшкірні шляхи від вищележачої шкіри в порівнянні з іншими підсвічуваннями. Зображення зеленого кольору забезпечувало кращу візуалізацію розрізнення лімфатичних судин і SLNs від навколишньої жирової тканини. LIGHTVISION має кілька обмежень викликаних великим розміром основного блоку і гнучкістю його camera arm.

IMAGE1 S™ Rubina ще одна технологія представлена на ринку, яка поєднує 3D та 4K зображення з флуоресцентною візуалізацією NIR/ICG для флуоресцентної хірургії. Джерело холодного світла POWER LED RUBINA™ засноване виключно на світлодіодній технології. Використана безлазерна технологія білого світла, а також технологія для флуоресцентних міток NIR/ICG діапазону або автофлуоресценції в ближньому інфрачервоному діапазоні. Система широко застосовується для найрізноманітніших завдань у хірургії, а саме: мультидисциплінарне застосування в лапароскопічній, ендоскопічній та відкритій хірургії; експрес-оцінка перфузії зони запланованої резекції, а також подальшого анастомозу у товстій кишці; інтраопераційна візуалізація метастазів та гепатоцелюлярної карциноми на поверхні печінки або під нею [26 -28].

FLUOBEAM від компанії FLUOPTICS - це ще одне інтегроване рішення для флуоресцентної візуалізації, представлене на ринку, яке надає хірургу під час операції додаткову інформацію, таку як перфузія тканин, ефективність лімфодренажу, а також розташування лімфатичних вузлів та паразитовидних залоз. Як і інші подібні системи, FLUOBEAM використовує систему оптичної візуалізації ближнього інфрачервоного діапазону (NIR), однак його оптична головка оснащена лазером класу 1 як джерело збудливого світла з чутливою до ближньої інфрачервоної області камерою. Це дозволяє виявляти флуоресцентні маркери вглиб на кілька міліметрів у біологічну тканину. Лазери класу 1 вважаються нешкідливими для очей навіть за прямої дії. Для видимого світла потужність вихідного променя до 0.39 мВ, відноситься до класу безпечних для "довготривалого" візуального контакту. Під терміном

"довготривалий" візуальний контакт розуміється час більше $\frac{1}{4}$ сек. У свою чергу клас 1 поділяється на два підкласи: 1 та 1М. Лазери класу 1М не можуть використовуватися спільно з оптичними інструментами, такими як бінокляр або збільшує скло. У документах, представлених виробником FLUOBEAM, не вказано точний тип лазера і виведення в підклас не описано.

3.3 Широкозастосовні та доступні для клінічного використання флуоресцентні візуалізаційні зонди

Індоціанін зелений (ICG)

В даний час ICG є одним із найбільш часто використовуваних флуорофорів NIR, які використовуються для FGS. ICG – це водорозчинний аніонний амфифільний трикарбоціаніновий зонд з молекулярною масою 776 Да [29, 30], який швидко зв'язується з білками плазми в організмі. Пік збудження становить 780 нм, а пік випромінювання – 820 нм, що знаходиться за межами діапазону автофлуоресценції більшості тканин. Значне перекривання спектрів поглинання та флуоресценції призводить до помітного повторного поглинання флуоресценції самим ICG. Спектр флуоресценції дуже широкий. Його максимальні значення становлять приблизно 810 нм у воді та приблизно 830 нм у крові. Для медичних застосувань на основі поглинання максимальне поглинання приблизно 800 нм (у плазмі крові при низьких концентраціях). У поєднанні з флуоресцентним детектуванням використовуються лазери з довжиною хвилі близько 780 нм [31]. Застосування ICG пов'язане з низьким ризиком побічних ефектів. Ризик алергічних реакцій становить один з 42 000. З міркувань безпеки застосування ICG протипоказане пацієнтам із недостатньою функцією печінки та алергією на речовини, що містять йод, про протипоказання, застереження, запобіжні заходи та побічні реакції, пов'язані із застосуванням препарату.

Зображення отримують з використанням джерел відфільтрованого світла та високочутливих камер із зарядовим зв'язком (ПЗЗ), які можуть

виявляти пікомолярні та фемтомолярні концентрації зонда з тимчасовою роздільною здатністю від секунд до хвилин.

ICG-лімфографія активно застосовується і в передопераційних діагностичних процедурах, зокрема при хірургічному лікуванні лімфедми, пов'язаної з раком молочної залози [35]. Це передопераційне дослідження полягає у введенні 0,1–0,2 мл індоціанінового зеленого барвника підшкірно в II та IV міжпальцевий простір обох рук. Барвник захоплюється та транспортується активними лімфатичними каналами та може бути візуалізований у режимі реального часу у вигляді флуоресцентних каналів на дисплеї. Весь іспит записується. Відразу після ін'єкції ICG-лімфографія показує швидкість підйому контрасту до пахової западини, а через 5 хвилин показує, де накопичується контраст, що дозволяє оцінити зворотний потік через шкіру. Також цей метод діагностики дає цінні доопераційні дані щодо ступеня ураження лімфатичної системи. Він не лише надає інформацію про кількість розширених лімфатичних каналів та їх зовнішній вигляд, але також показує точне розташування активних лімфатичних каналів та їхню транспортну здатність. Процедура обмежена можливістю візуалізації лише лімфатичних судин, глибина яких менше 2 см відносно поверхні шкіри. ICG-лімфографія також має першорядне значення під час операції ALNT. Це допомагає зрозуміти лімфатичний малюнок у кінцівці донорської ділянки. Оскільки автори зазвичай використовують поверхневі пахові вузли як донорські вузли для трансплантації в паховій западині, під час операції ALNT ICG-лімфографія дозволяє нам знайти лімфатичні вузли (LN), що дрениують нижню кінцівку, і виключити їх із клаптя.

Метиленовий синій (МВ)

Метиленовий синій (МВ) є гідрофобною молекулою ліків, яка має важливе значення як реагент для фарбування, так і як фармацевтичний агент. МВ є сильно флуоресцентним, з піком випромінювання при 686 нм (λ_{ех} 665 нм) і додатковим піком при 293 нм. З'єднання метилену синього має молекулярну масу 320 Так [36]. Це схвалений FDA видимий (темно-синій)

контрастний агент. При достатньому розведенні МВ діє як флуоресцентний барвник ближнього інфрачервоного діапазону, який працює в оптичному вікні NIR з піком поглинання при 670 нм і виводиться природним із сечею. Федеральне управління з лікарських засобів (FDA) і Європейське агентство з лікарських засобів (EMA) схвалили клінічне використання флуорофорів індоціанінового зеленого (ICG), метиленового синього (MB) і 5-амінолевулінової кислоти (5-ALA).

Клінічні властивості МВ обмежені його гідрофобною природою. Це причина, чому метиленовий синій забезпечує менше проникнення в тканини, водночас більше автофлуоресценції фонової тканини. Для порівняння, спектр флуоресценції ICG становить приблизно 800 нм, а 5-ALA має спектр приблизно 510 нм, за межами діапазону флуоресценції NIR [37, 38].

Для більшого розуміння доцільності вибору метиленовий синій як флуоресцентного барвника розглянемо деякі області, в яких можна використовувати хірургічну техніку під контролем МВ NIR. До першої з таких областей можна віднести локалізацію та диссекцію парашитовидних залоз, що досі залишається серйозною проблемою під час операції. Виявлення збільшених залоз часто утруднене через варіабельність їх кількості та розташування. В даний час на ринку доступно дев'ять методів ідентифікації парашитовидних залоз, п'ять з яких цікавлять нас у контексті цього огляду, а саме: автофлуоресцентна спектроскопія, автофлуоресцентна візуалізація, ICG-візуалізація, флуоресцентна візуалізація метиленового синього, 5-ALA [39 – 43]. Метиленовий синій традиційно вводять внутрішньовенно у високій дозі (3–7,5 мг/кг), щоб неозброєним оком можна було побачити збільшені парашитовидні залози, оскільки вони забарвлені в синій колір, але, як згадувалося раніше, ці дози пов'язані з багатьма побічними ефектами і слід застосовувати з обережністю [44,45]. Техніка NIR-флуоресценції дозволяє виявити залози за допомогою менших доз МВ. За даними Hillary et al. оптимальна доза для цієї методики становить 0,4 мг/кг, що дає змогу відрізнити парашитовидні залози від навколишньої тканини протягом

прийнятного часу [46]. Найнижча доза метиленового синього, яка була введена внутрішньовенно для диференціації парашитовидних залоз від навколишньої тканини щитовидної залози, становить 0,05 мг/кг. Найбільш цікавим спостереженням з вищевикладеного матеріалу є різке зниження ін'єкційної дози метиленового синього при флуоресцентному аналізі, що є важливим аргументом на користь його використання. Одним із обмежень використання метиленового синього є потенційне порушення функції нирок, оскільки він виводиться нирками. Іншим обмеженням є обмеження використання МВ тільки для пацієнтів, здатних конвертувати МВ у нефлуоресціюючий лейкометиленовий синій, що обумовлено зниженням та/або кислотністю навколишнього середовища. Алергічні реакції на МВ частіше виникають при дозах понад 5 мг/кг, тому застосовувати метиленовий синій слід у найменшій ефективній дозі [47, 48, 49].

Ще однією областю, де застосовується метиленовий синій є лікування нейроендокринної опухолі піджелудкової залози. Метиленовий синій накопичується в нейроендокринних пухлинах при внутрішньовенному введенні, але точний механізм цієї дії невідомий [50]. При внутрішньовенному введенні МВ флуоресценція NIR від підшлункової залози залишається відносно на тому самому рівні (3.0) співвідношення сигнал/фон протягом приблизно 60 хвилин. Залежно від використання МВ можна досягти іншого співвідношення сигнал/фон. Вищий коефіцієнт досягається, коли введення МВ відбувається швидким болюсом (5–20 с), порівняно з повільною інфузією (15–20 хв). Однак обидва способи введення МВ показали контрастність у підшлунковій залозі. Можлива неповна резекція у разі підозри на множинну ендокринну неоплазію [51]. У роботі [51] описано випадок, коли було недостатньо передопераційної діагностики методом магнітно-резонансної томографії з додатковим скануванням методом позитронно-емісійної томографії (ПЕТ). Використання візуалізації в діапазоні NIR з метиленовим синім дозволило візуалізувати нейроендокринні ураження під час операції, при цьому у всій підшлунковій залозі було виявлено більше 20 уражень не

встановлених іншими методами діагностики. Це відкриття спричинило зміну підходу хірурга (рис. 3.6).

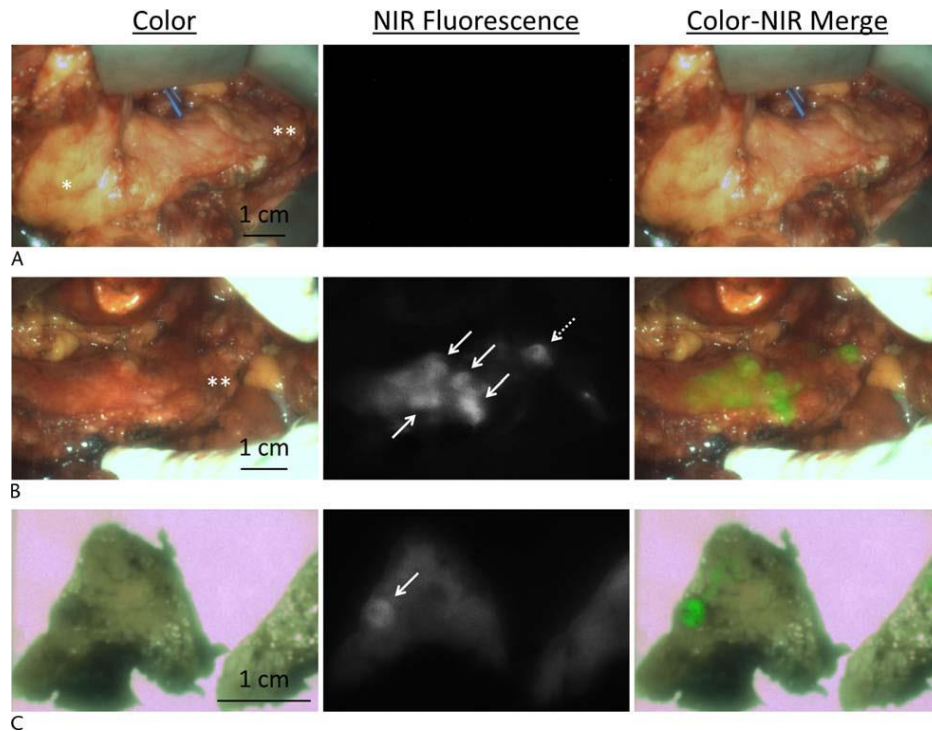


Рисунок 3.6 – Інтраопераційне та ex vivo ближнє інфрачервоне флуоресцентне зображення підшлункової залози. А - До внутрішньовенного введення МВ. В - П'ять хвилин після початку інфузії МВ. Множинні ураження в головці, тілі та хвості підшлункової залози флуоресцентні (час експозиції 50 мілісекунд). С - Ex vivo. Слабкі сигнали флуоресценції все ще видно (час експозиції, 200 мілісекунд) через 3 дні після резекції та фіксації формаліном. Білі стрілки: ураження, підозрілі на PNET [51].

5-амінолевулінова кислота (5-ALA)

5-амінолевулінова кислота, ендогенна непротеїногенна амінокислота, є першою сполукою на шляху синтезу порфірину. Порфірини є сполученими кислотами лігандів, які зв'язують метали з утворенням комплексів. Іон металу зазвичай має заряд 2+ або 3+. Амінолевулінова кислота показана дорослим для візуалізації злоякісної тканини під час операції з приводу злоякісної гліоми (III і IV ступеня). Він використовується для візуалізації пухлинної тканини в нейрохірургічних процедурах [52]. Дослідження, проведені раніше, показали,

що інтраопераційне використання цього флуорофору може зменшити залишковий обсяг пухлини та підвищити виживання без прогресування у людей із злоякісними гліомами [53, 54].

У роботі [55] Sybren et al досліджували можливість виділення та характеристики циркулюючих позаклітинних везикул пухлинного походження у пацієнтів з гліобластою за допомогою перорального введення 5-амінолевулінової кислоти. У разі гліобластоми (ГБ), злоякісної пухлини центральної нервової системи, діагностувати наразі можна лише за допомогою біопсії тканини. Тканини можна отримати за допомогою резекції або (стереотаксичної) біопсії, але ці інвазивні процедури становлять ризик для пацієнтів. Позаклітинні везикули (EV) — це невеликі клітинні везикули, які містять мікроРНК, білки та ліпіди, і є можливими кандидатами для рідкої біопсії. EV, отримані від GB, можна знайти в крові пацієнтів, але їх важко відрізнити від циркулюючих непухлинних EV. 5-амінолевулінову кислоту (5-ALA) перорально вводять пацієнтам із ГБ для полегшення візуалізації пухлини та максимальної резекції, оскільки вона метаболізується до флуоресцентного протопорфірину IX (PpIX), який накопичується в клітинах гліоми.

Чому так важливо отримати неінвазивність процедури і як це підвищує необхідність неінвазивних методів аналізу з використанням флуорофорів? Існують занепокоєння щодо впливу біопсії на саму патофізіологію пухлини, оскільки дослідження показали посилену проліферацію та міграцію пухлинних клітин після біопсії пухлини, що включало прискорений ріст пухлини в деяких випадках [56, 57]. Це робить повторні біопсії для подальшого спостереження або дослідницьких цілей наразі невиправданими, тим більше, що захворюваність і смертність цих процедур зростає з послідовними процедурами. Сучасні методи візуалізації, як МРТ, КТ і ПЕТ-КТ, не можуть надійно відрізнити справжню прогресію опухолі від псевдопрогресії. Одним із способів задовольнити потребу у подовжньому взятті зразків пухлини, мінімізуючи ризик для пацієнта, є рідкі біопсії [58].

5-ALA перорально вводиться пацієнту перед операцією і поглинається клітинами гліоми, де метаболізується в мітохондріях до флуоресцентного протопорфірину IX (PpIX) [59]. Потім PpIX накопичується в клітинах гліоми внаслідок зниження рівня ферохелатази та вибіркового поглинання АТФ-зв'язуючим касетним транспортером ABCB6 [60]. Під час збудження світлом з довжиною хвилі 405 нм підвищений рівень PpIX у клітинах гліоми змушує їх флуоресцювати яскраво-фіолетово-червоним кольором, що дозволяє легше ідентифікувати злоякісну тканину під час операції, щоб підвищити ймовірність максимальної хірургічної резекції (рис. 3.7) [61].

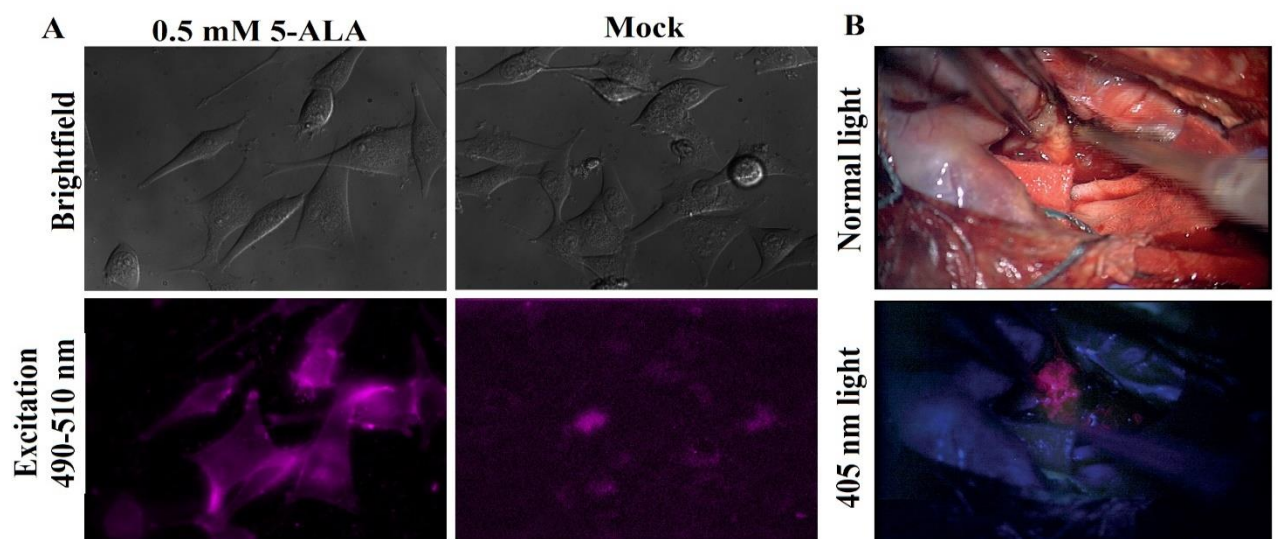


Рисунок 3.7 – (А) Клітини U87, оброблені 5-аміновуленовою кислотою (5-ALA) (ліві панелі), демонструють флуоресценцію PpIX при збудженні 490 нм випромінюванням у порівнянні з контролем (праві панелі). 40x збільшення, (В); вигляд резекції гліобластоми під час операції під білим світлом (верхній ряд) і під світлом 405 нм (нижній ряд). Флуоресценція протопорфірину IX (PpIX) видно у рожевому кольорі (фрагмент рис. 1. із [55]).

Використовуючи вдосконалене проточне цитометричне сортування з високою роздільною здатністю, ми можемо виділити PpIX-позитивні EV з плазми пацієнтів із ГБ. За допомогою цифрової краплинної ПЛР ми можемо виявити пухлиноспецифічні мікроРНК лише в 5 відсортованих PpIX-

позитивних EV. Ці дані ілюструють можливості флуоресцентної рідинної біопсії на основі позаклітинних везикул у пацієнтів з гліобластою.

Автори роботи стверджують, що отримані дані показують можливість виділення PpIX-позитивних EV, що виходять з гліобластоми, з плазми після перорального введення 5-ALA за допомогою сортування методом проточної цитометрії з високим дозволом. Однак використання 5-ALA було обмежено його відносно високою вартістю та високим ризиком сенсibilізації шкіри протягом 24 годин після операції (пацієнт не повинен піддаватися впливу сонячного світла або сильного штучного світла).

Флуоресцеїн натрію

Флуоресцеїн натрію (NaFl) є біологічно безпечним флуоресцентним барвником, який екстравазує через порушення гематоенцефалічного бар'єру (ГЕБ) [62-64]. Цей препарат можна вводити внутрішньовенно для поліпшення візуалізації опухолевої тканини головного мозку, що базується, головним чином, на неспецифічному судинному витоку. Флуоресцеїн натрію є натрієвою сіллю та органічним флуоресцентним барвником з піком збудження при 494 нм і піком випромінювання при 512 нм. В якості допоміжного засобу при резекції внутрішньочерепного гліому флуоресцеїн натрію застосовується з 1940-х років і він вважається безпечним. Завідома частота побічних реакцій змінюється від 1% до 6% [65]. Найбільша кількість побічних реакцій спостерігалася при пероральному застосуванні, при внутрішньовенному введенні повідомлень про побічні реакції при перерахунку на кількість випадків використання не спостерігалася. Хоча серед побічних реакцій був зафіксований випадок внезапної смерті через анафілактичний шок, його можна віднести до індивідуальної непереносимості [66]. Простий прик-тест може допомогти виявити осіб із найбільшим ризиком побічної реакції. Також спостерігається активне використання препарату в офтальмології для ангіографії сітківки із-за відносно низької вартості флуоресцеїну натрію в порівнянні з вартістю 5-ALA [67]. Флуоресцеїн натрію зазвичай видно неозброєним оком при високих дозах (20 мг/кг маси тіла) і спостерігається

через жовтий фільтр 560 нм при низьких дозах, що дозволяє краще розрізняти тканини з більш природними кольорами [68, 69].

У роботі [70] наведено випадки використання інтраопераційного флуоресцеїну натрію для діагностичної біопсії тканин при ураженнях спинного мозку. Трьом пацієнтам віком 55, 51 та 68 років після консервативного лікування було призначено оперативне втручання з метою проведення біопсії новоутворення. Клінічна картина всіх пацієнтів включала односторонню чи двосторонню слабкість у кінцівках. Пацієнтку 55 років з прогресуючим болем у спині NaFl вводили під час розрізу шкіри у дозі 3 мг/кг. Під мікроскопічним контролем флуоресцеїну ураження було легко ідентифіковано та отримано біопсію (рис. 3.8).

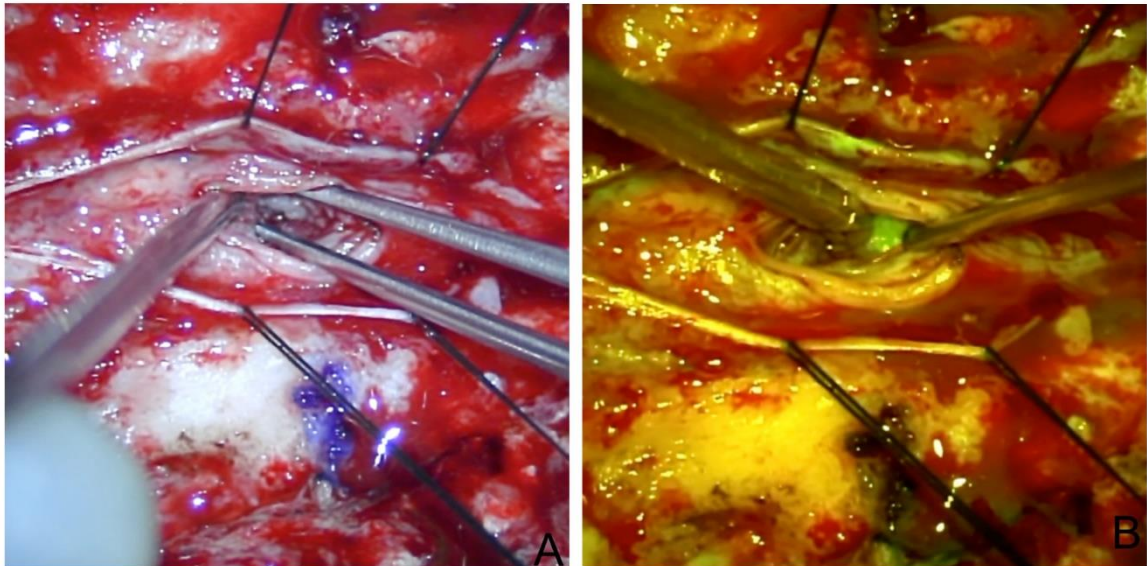


Рисунок 3.8 – Інтраопераційні мікроскопічні зображення NaFl, що демонструють ураження під час мікроскопічної дисекції та біопсії [70].

Проілюстровані в роботі [70] випадки демонструють доказ концепції того, що NaFl може бути корисним для резекції та біопсії уражень хребта, таких як гліоми високого ступеня злоякісності, пилокістозна астроцитомома та епендимомома. У цих пацієнтів використання флуоресцеїну натрію виявилось корисним для локалізації патологічної тканини. Остаточна патологія продемонструвала грампозитивні бактерії/інтрамедулярний абсцес, В-клітинну лімфопроліферативну хворобу, спричинену EBV, і первинне гліальне

новоутворення. Лікуючому хірургу важко відрізнити аномальну тканину від паренхіми спинного мозку, і автори роботи заявляють, що Fluorescein Sodium був надзвичайно корисний при ідентифікації аномальної тканини. Fluorescein Sodium є корисним інструментом для ідентифікації області резекції та взяття зразків інтрамедулярних та внутрішніх уражень хребта, коли повна резекція небажана.

3.4 Нові зонди флуоресцентної візуалізації

Флуоресцентні барвники, які ми розглянули в попередньому розділі самі по собі зазвичай не мають пухлинної специфічності, тому виникла потреба у флуоресцентних агентах молекулярної дії. Так звані трасери складаються з флуорофору, хімічно кон'югованого з націлюючим компонентом, останній має афінність зв'язування зі специфічною раковою молекулярною мішенню або біомаркером. Цільові трасери, бувають «завжди активними» та «активовані» та/або «розумні» зонди. Трасери, які завжди флуоресціюють, називаються «завжди активними» цільовими трасерами [71]. «Розумні» зонди не флуоресцують до тих пір, поки не активуються на мішені, пригнічуючи неспецифічні флуоресцентні сигнали і збільшуючи контраст пухлина/фон [72].

У цьому представляє інтерес робота [73]. Автори роботи використовували рекомбінантний мембранний білок *Helicobacter pylori* (HspQ), кон'югований з флуорофором IR800DyeCW для націлення на молекули клітинної адгезії, пов'язані з карциноембріональним антигеном (CEACAM), які експресують колоректальні пухлини. Слід відзначити, що представлені результати отримані тільки на дрібних тварин (мишах) і вимагають додаткових досліджень перед клінічним застосуванням. Раніше карциноембріональний антиген (CEA) був визначений як ідеальна мішень для візуалізації *in vivo*, спеціально спрямованої на колоректальні пухлини [74]. CEA, також званий CEACAM5 або CD66e, є глікофосфатидилінозитолом (GPI), закріпленим на поверхні клітини, глікопротеїном, який, як було

виявлено, має надлишкову експресію в більшості випадків колоректального раку [75]. Нещодавно було показано, що *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) специфічно зв'язується через білок зовнішньої мембрани HopQ з CEACAM1, 3, 5 і 6 людини [76,77]. Взаємодія HopQ-CEACAM, здається, не залежить від кальцію, а також від рН і необхідна для транслокації онкогенного ефекторного білка CagA в клітини-господарі людини [78].

Візуалізація новоутворень здійснювалася за допомогою системи візуалізації мілких тварин LI-COR Pearl Trilogy (LI-COR, Лінкольн, Небраска), яка обладнана для флуоресцентної візуалізації при 700 і 800 нм.

Ми хочемо звернути увагу читачів, в особливості біоінженерів, що займаються розробкою та вдосконаленням системи для флуоресцентної хірургії, на переваги, які використовуються в цій системі. У ближньому ІК-спектрі аутофлуоресценція тканин значно знижена, що дозволяє бачити тканини розташовані глибоко всередині тіла тваринного в даному випадку. LI-COR Pearl Trilogy використовує Pearl Trilogy, яка включає лазерне вилучення в діапазоні NIR із системою фільтрів для отримання "прозорих тканин". Це призводить до різкого збудження світла в межах вузьких довжин хвиль, викликаючи мінімальну дифузю в полі зображення ($CV < 3\%$). Виробник системи в свою чергу пропонує своє цікаве рішення, а саме використання двох спектрально різних фарбників для маркування мішені з реєстрацією флуоресценції двох каналів на 700 і 800 нм. Негативним фактором може стати насиченість зображення у високій інтенсивності сигналу, після чого дані перестають бути когерентними. Тепловізори з обмеженим динамічним діапазоном не можуть одночасно виявляти сигнали, що відрізняються більш ніж на 3 або 4 логарифми (від 1000 до 10 000 X) [79].

Однак повернемося до результатів, отриманих у роботі [73]. Ортотопічні моделі клітинних ліній раку товстої кишки ($n=6$) були зображені через 48 годин після введення 50 мкг rHopQ-IR800. Краї пухлини були чітко визначені із середнім співвідношенням пухлини до фону ($TBR=3,678$ ($SD\pm 1,027$)). Ортотопічна модель клітинної лінії раку товстої кишки LS174T включала

регіональні метастази діаметром приблизно 2 мм, які також чітко спостерігалися за допомогою флуоресцентної візуалізації, які в іншому випадку були невидимі (рис. 3.9). При цьому значення гНор-IR800 TBR 3,678 є кращим результатом у порівнянні з попередніми дослідженнями авторів, де SEACAM 6G5j-IR800 має TBR 3,17 [80].

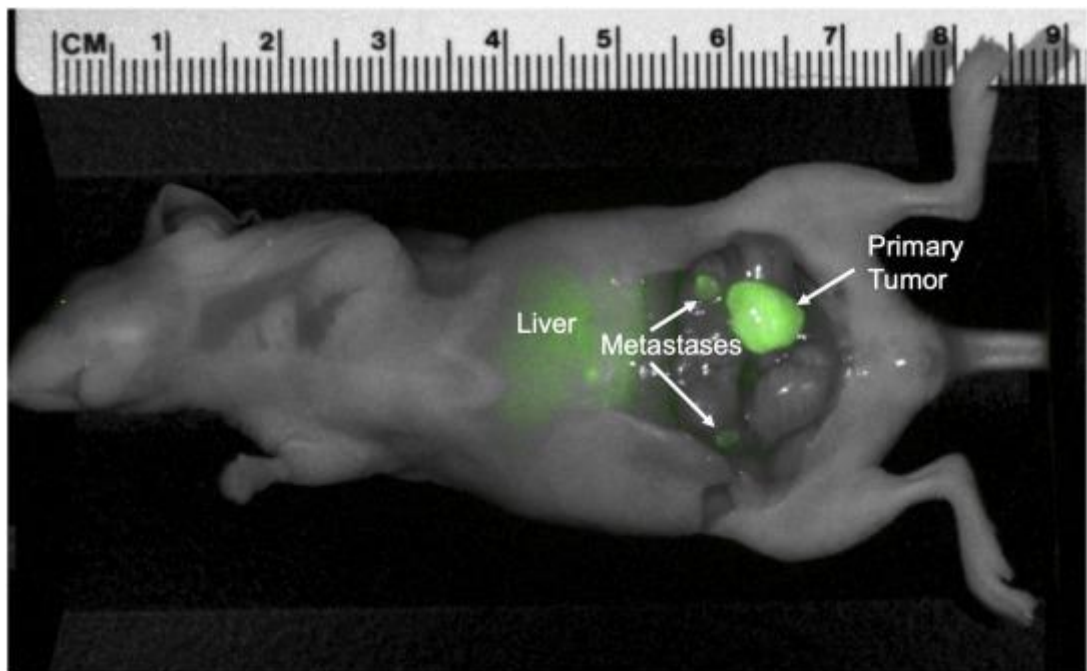


Рисунок 3.9 – Типове зображення ортотопічної моделі клітинної лінії раку товстої кишки (LS174T) через 48 годин після введення 50 мкг гНорQ-IR800 [73].

Важливо відзначити, що гНорQ зв'язується з SEACAM1 [81,82] навіть у поєднанні з різними флуорохромами або біотином. Тому гНорQ можна використовувати для широкого спектру застосувань, включаючи проточну цитометрію, ELISA, вестерн-блоттинг та імуногістохімічні підходи. На відміну від глікозилізованих антитіл, гНорQ є бактеріальним білком без глікозилювання, що захищає його від деградації.

Розглянуте дослідження демонструє високу афінність зв'язування гНорQ з епітеліальними раковими опухольми, надекспресивними SEAC, включаючи рак товстої кишки, шлунку та легень. Рекombінантна

флуоресцентна візуалізація з підтримкою NorQ забезпечує чіткі межі первинних пухлин і метастазів у мишачих моделях раку товстої кишки PDOX і ортотопічних клітинних лініях. Це означає, що гNorQ може бути корисною альтернативою SEACAM-специфічним антитілам для передхірургічної діагностики, інтраопераційної візуалізації та хірургії під контролем флюоресценції.

3.5 Особливості діагностики первинного раку маткових труб під час і після операції

Стосовно проблем діагностики РМТ під час операцій в доступній літературі ми не зустріли робіт узагальнюючого характеру. Переважають описи окремих спостережень РМТ, часто без аналізу причин помилок діагностики. Під час операцій, крім візуального огляду, практично у всіх хворих, проводиться ревізія органів черевної порожнини і регіонарних груп лімфатичних вузлів (ЛУ) шляхом пальпації. Однак, пальпація ЛУ дозволяє виявити не більше 10% макрометастазів у хворих уражених метастазами. В даний час є можливим достовірно діагностувати метастази в ЛУ до операції за допомогою магніторезонансної томографії (МРТ).

Останнім часом в онкогінекології при лапароскопічних операціях активно впроваджуються методи візуалізації лімфатичної системи на тлі флюоресценції маркера індоціанина зеленого (технологія OPAL1® для NIR / ICG та ін.). Методики не радіоактивні, але дозволяють в реальному часі бачити і оцінити стан ЛУ і лімфошляхів на глибині до одного см. На жаль свого досвіду ми не маємо і не знайшли в літературі повідомлень про застосування цієї методики при РМТ. Таке дослідження, за даними Marie Plante і співавт. (2015), дозволяє у хворих на рак шийки та тіла матки виявити навіть мікрOMETASTAZI, причому чутливість, специфічність і точність методики досягає 93,8%, 100% і 98,7% відповідно. Слід сподіватися, що і у хворих РМТ результати будуть аналогічними.

Міжнародна федерація акушерів-гінекологів (FIGO), з метою адекватного стадіювання, рекомендує під час операцій робити мазки або змиви з черевної порожнини для цитологічного дослідження. Це може бути використано і для діагностики РМТ, особливо у випадках неможливості субопераційного гістологічного дослідження. Значні діагностичні проблеми виникають і у морфологів, при вирішенні питання первинного враження між РМТ, яєчників або інших органів.

Мета дослідження: вивчення можливостей діагностики РМТ при лапароскопії, ревізії при лапаротомії, макроскопічному огляді та вивченні видалених препаратів, застосуванні субопераційного гістологічного і цитологічного дослідження, можливостей і проблем морфологічної інтерпретації цих пухлин після операцій.

Результати дослідження та їх обговорення. Залежно від вираженості пухлинного процесу та можливостей діагностики під час лапароскопії або ревізії при лапаротомії наші спостереження були розділені на три групи.

Згідно з нашими спостереженнями, початкові (які маскуються) форми пухлин були у 41 (39,0%) хворої РМТ. Розміри уражених труб у цих хворих коливалися від ледь помітного потовщення ампулярного відділу до «гідрогематосальпінксів», що займають малий таз і доходять до рівня пупка. Їх розміри більше залежали від кількості рідинного вмісту в трубі, а не пухлинного вогнища. Найчастіше (26/41-63,4%), в цій групі обстежених, уражені труби нагадували гідрогематосальпінкси. Вони були у вигляді реторти або мали ковбасоподібну форму і гладку блискучу поверхню. У 13/41 (31,7%) хворих внаслідок розповсюдження пухлинного процесу, імітуючого піосальпінкс, поверхня труби була нерівномірного забарвлення і здавалася тьмяною. Забарвлення уражених труб у 29/41 (70,7%) хворих мала різні відтінки ціанотичного, ціанотично-червоного або синьо-багряного кольору. Інколи зустрічались біло-жовті плями на місці проростання, або підростання пухлини до серозної оболонки, особливо при явищах некрозу пухлинної тканини. В інших 12/41 (29,2%) хворих уражені маткові труби мали

більш світле забарвлення, від блідо-рожевого до біло-жовтого на різних ділянках труби (рис. 3.10).

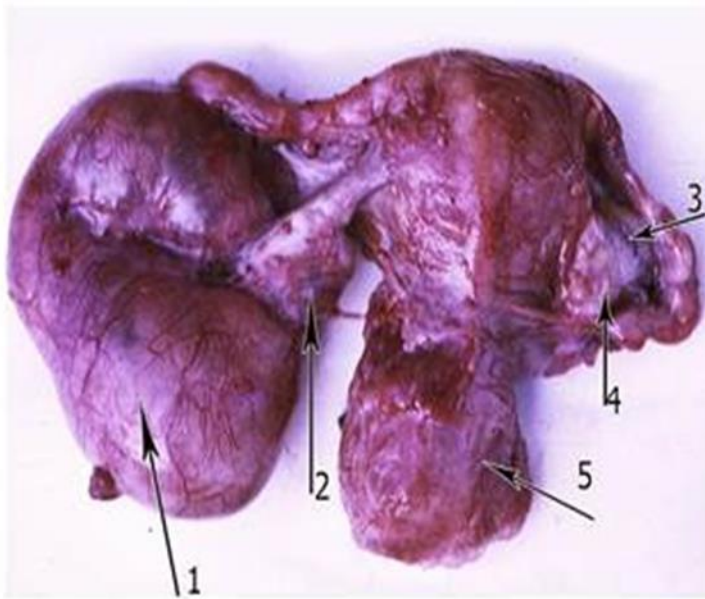


Рисунок 3.10 – Матка з придатками: 1 – ліва маткова труба з «гідросальпінксом» у вигляді звивистої реторти; 2 – лівий яєчник; 3-права маткова труба; 4-правий яєчник; 5 – шийка матки. Оригінальний вигляд.

Уражені маткові труби у 16/41 (39,0%) хворих зберігали звичайне розташування і рухомість. Обмеження їх рухомості у 25/41 (61,0%) хворих було викликано спайковим процесом з маткою, широкою зв'язкою, великим сальником, стінками тазу і рідко - з Дугласовою кишенею. Консистенція уражених труб у 26/41 (63,4%) хворих була тугоеластичною, у 15/4 (36,5%) - нерівномірної щільності. На такому етапі розвитку пухлини, навіть у випадках клінічної підозри і ретельної пальпації, не завжди вдавалося визначити ділянки ущільнення на місці пухлинного ураження. Поряд з РМТ у 15/41 (36,5%) хворих була виявлена лейоміома матки, у 11/41 (26,8%) - гідросальпінкс протилежної труби, у 4/41 (9,7%) - кіста яєчника. Супутні захворювання, особливо при клініці «гострого живота», іноді маскували РМТ та провокували помилковий діагноз під час операції.

Під час огляду (після поздовжнього розрізу ураженої труби) видалених макропрепаратів на слизовій труби виявлялися різні по локалізації, характеру

і розміру вогнища пухлини, як правило у вигляді екзофітних розростань в просвіт труби (рис. 3.11). Розміри пухлинного вогнища у цій групі обстежених коливалися від шорсткої бляшки на слизовій труби розміром 1x1 см або вузлика в діаметрі 0,6-0,8 см до пухлинного вузла діаметром 3-4 см або множинних пухлинних розростань. У більшості спостережень (24/41-58,5%) пухлина була в вигляді ділянок сіро-рожевих крихких сосочкових утворень, що відрізняються за кольором від оточуючих нормальних тканин, іноді в вигляді оксамиту або «цвітної капусти». Рідше осередки пухлин нагадували поліпоподібні, грибоподібні або мізкоподібні утворення.

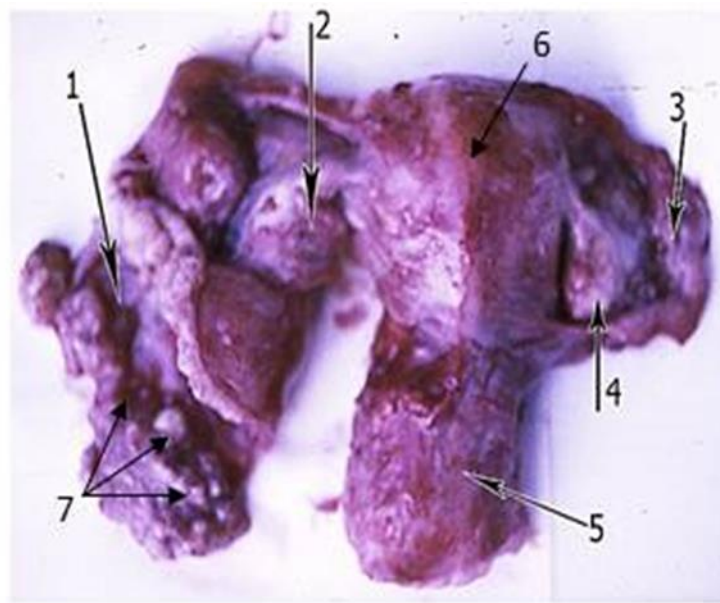


Рисунок 3.11 – Матка з придатками: 1 – ліва маткова труба; 2 – лівий яєчник; 3-права маткова труба; 4-правий яєчник; 5 – шийка матки; 6 – матка; 7 – ампулярний відділ лівої маткової труби з множинними папілярними розростаннями пухлини. Оригінальний вигляд.

В окремих спостереженнях пухлина була на широкій основі або у вигляді вузла на ніжці. Часом поверхня таких вузлів була сірувато-білого кольору і гладка, ніби покрита капсулою. При гістологічному дослідженні така «капсула» являла собою тонку сполучнотканинну плівку з фібринозними нашаруваннями. Виявилося, що у таких хворих при цитологічному дослідженні пухлинні клітини не виявлені навіть у вмісті ураженої труби. Це

одна з причин відсутності пухлинних клітин при цитологічному дослідженні патологічних виділень при РМТ. Тільки у трьох, з цієї групи оперованих, уражені труби були як суцільне ковбасоподібне утворення з невеликим поздовжнім каналом в центрі.

На розрізі пухлинна тканина часто була з вогнищами крововиливів або некрозу. Пухлинний осередок в переважній кількості спостережень (29/41-70,7%) локалізувався в ампулярній частині труби. Значно рідше (7/41-17,0%) зустрічались ураження істмічного відділу або первинно множинні розростання пухлини майже по всій довжині труби (5/41-12,0%).

Діагностична лапароскопія нами застосована у 10 хворих РМТ. До лапароскопії у 4 з них сонографічно було висловлено підозру на малігнізацію гідросальпінкса. Решта - йшли на операцію під «спокійними» діагнозами кіст або гідросальпінксів, а РМТ виявився операційною знахідкою. Методика, на відміну від візуального огляду при лапаротомії, не тільки менш травматична, але завдяки потужному освітленню та збільшенню більш інформативна. При лапароскопії більш чітко простежуються описані вище зміни забарвлення і структури поверхні «гідро-гематосальпінксів». Вже на початкових етапах ураження пухлиною серозної оболонки труби виявляються ділянки з втратою блиску та появою шорсткості, що викликає підозру на малігнізацію. Для підтвердження діагнозу, у 5 з 10 обстежених лапароскопічно хворих, застосовано субопераційне морфологічне дослідження. У 3-х хворих, оперованих в неонкологічних стаціонарах, діагноз РМТ встановлений тільки після планового гістологічного дослідження. Ці (3-30%) діагностичні помилки зумовленні неадекватним макроскопічним обстеженням видалених маткових труб під час операцій.

У хворих з початковими та сумнівними формами РМТ, особливо в молодому віці, для уточнення діагнозу та обґрунтування радикальності хірургічного втручання, нами застосовані субопераційні методи гістологічної та цитологічної експрес-діагностики. Всього обстежено 18 хворих, у яких проведено гістологічне дослідження підозрілих ділянок труби та цитологічне

дослідження мазків-відбитків з розрізів передбачуваної пухлини. Одночасне застосування обох методик дозволило порівняти їх діагностичну цінність. Виявилося, що при гістологічній експрес-діагностиці та цитологічному дослідженні мазків-відбитків з розрізів пухлини висновки були ідентичні. Достовірність, відносна простота та доступність, особливо цитологічного дослідження мазків-відбитків з розрізу пухлини, дозволяє використовувати їх з метою експрес-діагностики РМТ під час операцій, що рекомендують і інші автори. Згідно рекомендацій FIGO, (з 90-х років ХХ століття) для адекватного стадіювання і прогнозування, у всіх хворих РМТ бралися мазки або змиви з черевної порожнини для цитологічного дослідження.

Клінічно виражений РМТ, нерідко зі значним поширенням, але з макроскопічною можливістю віддиференціювати від інших пухлин під час операції виявився у 53/105 (50,5%) хворих. Пухлинне ураження і первинний осередок в більшості спостережень не викликали сумнівів. Уражені труби часто мали нерівномірну консистенцію, забарвлення і обмежену рухомість через спаяність або зрощення. У випадках виходу пухлини за межі труби і зрощення з сусідніми органами, особливо яєчниками, виникала проблема з визначенням первинності осередку ураження. Такі складнощі відзначені нами у 10/53 (18,9%) з цієї групи обстежених, оскільки яєчники візуально і пальпаторно чітко не визначалися. Після роз'єднання спайок і огляду видаленого макропрепарату на розрізі виявилося, що у 5 хворих яєчники розпластані на капсулі великої ковбасовидної труби, а у трьох - були замуровані в зрощеннях, але без підозри на ураження пухлиною. У решти двох хворих яєчники були кістозно змінені, спаяні з матковою трубою, але мали окрему від неї порожнину без ознак проникнення пухлинних тканин в кісту яєчника. Макроскопічні заключення в подальшому були підтверджені гістологічним дослідженням сумнівних ділянок тканин.

Клінічні варіанти РМТ, при яких під час операцій не довелося встановити достовірний топічний діагноз виявилися у 11/105 (10,5%) хворих. У більшості цих спостережень придатки представляли конгломерат масивних

утворень (особливо при двосторонньому РМТ) заповнюючих малий таз, а іноді й з поширенням за його межі. Інтерпретацію ускладнював вихід пухлини за межі труби, спаяність з сусідніми органами, поєднання з запальним процесом. У двох, з цієї групи хворих, був виставлений діагноз піосальпінкса, так як вони, з клінікою «гострого живота», ургентно були прооперовані не онкологами. Крім того, у трьох хворих пухлиною були вражені яєчники, а у двох - виявити їх макроскопічно під час операції не вдалося. Остаточний діагноз встановлений після операції на підставі ретельного макроскопічного і клініко-морфологічного аналізу.

При вивченні гістологічного типу пухлин 105 обстежених хворих констатовано, що 87 (82,8%) неоплазій становили серозні аденокарциноми маткових труб різного ступеня злякисності (рис. 5.3–1). Основою визначення диференціювання служила структурна перебудова пухлинної тканини і атипія ядер епітеліальних клітин. Пухлини високого ступеня злякисності (high-grade), що включали низько- і помірно диференційовані карциноми (G2, G3) і пухлини низького ступеня злякисності (low-grade), які включали високодиференційовані карциноми (G1). У нашій групі обстежених більшість пухлин маткових труб (79-90,8%) становили пухлини помірної та низької диференціації, що характеризує РМТ як вкрай агресивну пухлину.

В окремих спостереженнях пухлинні клітини виглядали як дрібні лімфоцитоподібні з майже відсутньою цитоплазмою та гіперхромними ядрами, що викликало підозру на лімфому. Іноді поліморфізм пухлинних клітин був настільки виражений, що гістологічно було важко віднести їх до епітеліальних злякисних пухлин. У таких випадках для верифікації морфологічного діагнозу ми проводили імуногістохімічне дослідження (ІГХ) тканин з визначенням експресії панцитокератину (антиген епідермальних пухлин) і загального лейкоцитарного антигену. Позитивна цитоплазматична експресія панцитокератину у всіх ракових клітинах вказала на приналежність неоплазії до пухлин епітеліального походження високого ступеня злякисності (рис. 3.12).

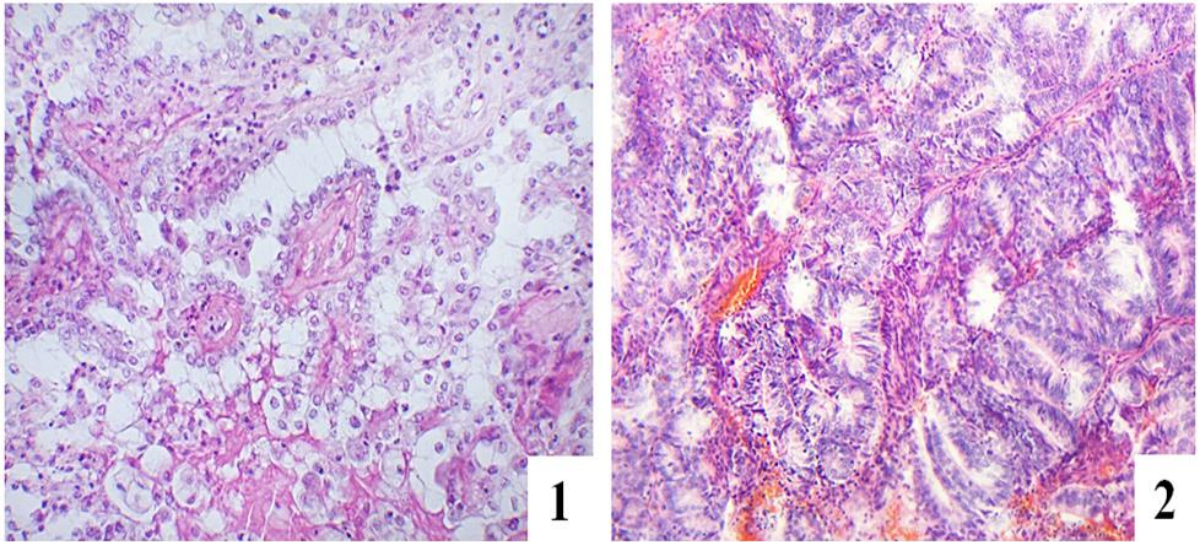


Рисунок 3.12 – Аденокарцинома маткової труби: 1 – серозна аденокарцинома високого ступеня злякості; 2 – помірнодиференційована (G2) ендометріюїдна аденокарцинома. Зabarвлення гематоксилін-еозином.

Збільшення: $\times 200$

Подальше використання маркерів CK7, CK20 дозволило нам встановити серозну природу неоплазії. При диференціальній діагностиці між первинним муцинозним РМТ та метастатичними враженнями труби, які також можуть містити кістозні структури (в першу чергу пухлини шлунка, кишківника, підшлункової залози). Позитивна експресія CK7 і CK 20, негативна експресія CDX-2 дала можливість встановити первинну локалізацію муцинозної карциноми в матковій трубці (рис. 3.13).

Серед обстежених 105 хворих РМТ також виявлено 12 (11,4%) випадків ендометріюїдної аденокарциноми (рис. 5.3–2), два (1,9%) - муцинозної аденокарциноми та по одному випадку карциносаркоми, світлоклітинної, плоскоклітинної карциноми і нейроендокринної пухлини. Ендометріюїдні аденокарциноми були представлені залозистими структурами різних розмірів і форм, що нагадують аденокарциноми ендометрія, іноді з вогнищами плоскоклітинної диференціації. Випадки муцинозної аденокарциноми характеризувалися наявністю на внутрішньому епітеліальному покриві камер

і папілярних структур різноманітних поліморфних клітин цервікального і кишкового диференціювання.

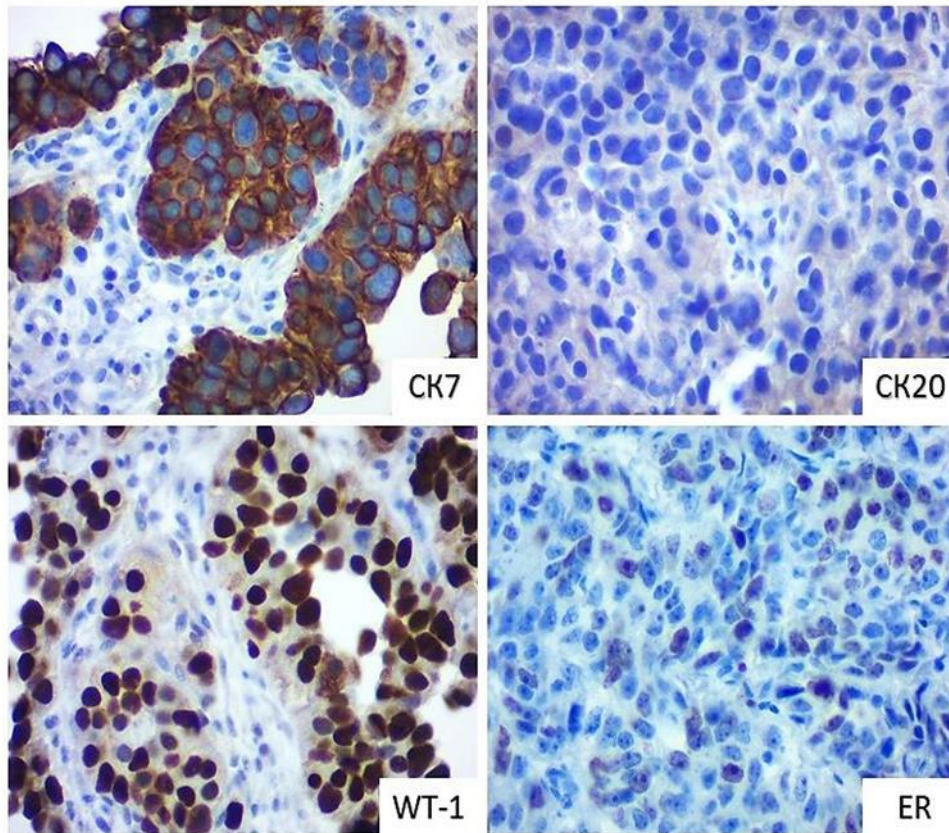


Рисунок 3.13 – Серозна аденокарцинома маткової труби. Імуногістохімічне забарвлення: CK7, CK20, WT-1, ER. Збільшення: $\times 400$.

Нейроендокринна пухлина складалася з однотипних клітин з дрібногранулярним ("salt and pepper") ядерним хроматином з формуванням гнізд, анастомозуючих ланцюжків і структур типу периферичних «палісадів» і «розеток». Ця пухлина мала імунофенотип, властивий для нейроендокринних пухлин (клітини диффузно- позитивні до хромограніна А та CD56). В даному спостереженні пухлина виявилася CDX2 і TTF1 негативною, а загальноклінічне обстеження не виявило доказів пухлинного ураження інших органів. Ці дані дозволили вважати виявлену нами пухлину первинною нейроендокринною пухлиною маткової труби.

Підводячи підсумки дослідження слід зазначити, що з 105 хворих РМТ у 7(6,6%) пухлина під час операції не була діагностована, а у 18(17,1%)

діагноз встановлений тільки після субопераційного гістологічного дослідження. Слід думати, що ймовірність помилок під час операцій при початкових формах РМТ (без ретельного вивчення макропрепаратів і субопераційного морфологічного дослідження) може досягати 23,8%. Крім того, у 11 (10,5%) хворих, з вираженим пухлинним процесом, виникли проблеми з інтерпретацією первинного осередку. Це потребувало спеціальних морфологічних досліджень після операцій, хоча в основному не позначилося на виборі адекватного гістологічно обсягу хірургічного лікування. Поширення пухлини за межі маткової труби виявлено у 69 (72,4%) хворих, серед них у 25 (26,2%) - метастази в ЛУ. Метастази в ЛУ методом пальпації виявлено тільки у 9(36%) з 25 хворих з гістологічно підтвердженими метастазами.

Переважає кількість хворих РМТ, на відміну від хворих на рак яєчників, через рідкісну частоту та особливості клінічного перебігу йдуть на операції з помилковими діагнозами. Несподіваність, відсутність досвіду, неадекватна ревізія і вивчення макропрепаратів є причинами 30-50% помилкових діагнозів і під час операцій. Заспокоює те, що значна кількість з них складають помилки у визначенні первинності вогнища злоякісного процесу і такі помилки мало впливають на вибір адекватного хірургічного лікування [62].

Судячи по числу публікацій, 9 наукових робіт з 2002 по 2020 рік, лапароскопія ще не зайняла належне місце в діагностиці РМТ. Вона як метод субопераційної діагностики, після розробки семіотики початкових форм РМТ на тлі гідро-гематосальпінксів, повинна зіграти важливу роль в діагностиці ранніх стадій цієї пухлини. Особливо в групі хворих з незрозумілими утвореннями придатків матки, виявленими променевими методами.

З огляду на рідкісну частоту та «закритість» початкових форм РМТ, його часте прогресування під маскою гідро-гематосальпінксів, запідозрити пухлинне ураження при лапароскопії, без проростання пухлиною всіх шарів стінки труби - складно. Слід пам'ятати, що при підозрі на РМТ з метою морфологічної субопераційної діагностики не припустимі пункція і розтин «гідросальпінкса» або необережне виведення видаленої труби через

портальний отвір. Це загрожує порушенням абластики та ризиком виникнення імплантаційних метастазів, що значно погіршує прогноз для хворих. Про це свідчать і спостереження ряду авторів.

Програма лікування, обсяг операції і виживаність хворих РМТ значною мірою залежать від адекватності стадіювання. За сучасними протоколами, під час операцій при пухлинах геніталій хірург не може достовірно визначити метастази в ЛУ шляхом пальпації. При такому обстеженні ми виявили метастази тільки у 9(36%) із 25 хворих з метастазами підтвердженими гістологічно. Це макрметастази, які і при других пухлинах жіночих статевих органів, згідно результатів дослідження ряду авторів, виявляються менше ніж у 10% хворих з метастазами.

При відсутності можливості визначити під час операції стан сторожових ЛУ методом флюоресцентної візуалізації з ближнього інфрачервоного випромінювання на тлі індоціаніну зеленого, необхідне адекватне обстеження хворих перед операцією. Воно, з метою виявлення уражених метастазами ЛУ, має включати МРТ. Наприклад, діагностика метастазів при раку шийки і тіла матки за допомогою дифузно-зваженої МРТ показала, що вона володіє значними діагностичними можливостями (чутливість до 100%, специфічність до 96% і точність методу до 96,5%). На жаль, через рідкісну доопераційну діагностику РМТ, це далеко не завжди можливо.

Практично, в зв'язку з великою лімфотропністю пухлини, всім хворим РМТ показана лімфаденектомія. У випадках протипоказань до такої операції, з метою адекватного стадіювання і планування лікування, допустимо обмежитися біопсією або пальпацією і пункцією підозрілих лімфатичних вузлів з морфологічним дослідженням.

Морфологічна структура епітеліальних новоутворень маткової труби характеризується великою різноманітністю і переважно високим ступенем злякисності HGC (high-grade carcinoma). Завжди важливо визначити їх імунофенотип за допомогою імуногістохімічних маркерів. При незрозумілих і

особливо тубооваріальних новоутвореннях завжди виникає проблема - це первинне ураження маткової труби або метастаз з інших органів. У таких ситуаціях навіть можливості ІГХ обмежені, оскільки епітеліальні пухлини маткової труби і яєчника мають подібний імунофенотип. У маткових трубах можуть одночасно зустрічатися пухлини неоднорідні за гістологічною структурою. Саме тому, щоб уникнути помилок при інтерпретації цих рідкісних і складних новоутворень завжди слід ретельно досліджувати післяопераційний матеріал та проводити забір тканини з різних ділянок пухлинного росту. При цьому, важливим аспектом діагностики залишається комплексний гістологічний та імуногістохімічний аналіз матеріалу, часом з використанням комп'ютеризованого обладнання з вбудованою програмою візуальної оцінки, що дозволяє достовірно визначити гістологічну структуру, ступінь злоякісності і поширення пухлини, а також дає можливість адекватно планувати лікування хворих.

ВИСНОВКИ

1. У тканині ендометріальних карцином зростає рівень експресії ЦОГ2, який залежить від гістологічних особливостей пухлин та їх диференціювання. Надекспресія ЦОГ2 призводить до посилення проліферації пухлинних клітин, інгібуванню апоптозу, посиленню експресії VEGF та МСЦ, пригніченню експресії PR та зростанню інфільтрації тканини ЕС М2-макрофагами. При цьому експресія СОХ2 не впливає на рівень ER, EGFR, та MMP1, а також не залежить від віку хворих та FIGO стадії.

2. Прогресування ЕА супроводжується якісними та кількісними варіаціями паренхіматозного та стромального патернів пухлин. Дедиференціювання ЕА призводить до надекспресії VEGF, яка має дифузний характер у клітинах. Результатом цього є посилення МСЦ аденокарцином та посилення їх метастатичного потенціалу. Кореляційні зв'язки між гістологічними та імуногістохімічними особливостями ЕА свідчать про синхронність виникнення та прогресування морфологічної та імунологічної анаплазій, що можна використовувати при прогнозуванні перебігу захворювань. Тканина ендометрію демонструє різну експресію рецепторів МКА-РЕА1 та Е-кадгерину у нормальному ендометрії та при ендометріїдних аденокарциномах. Це свідчить про відсутність будь-якої функціональної кореляції між ними. Варіабельність патернів експресії МКА-РЕА1 та Е-кадгерину при дедиференціюванні аденокарцином може бути індикатором неопластичної трансформації та прогресування злякисного процесу.

3. Інвазивний плоскоклітинний рак шийки матки характеризується варіабельністю гістологічної будови пухлин при їх дедиференціювання. Ступінь диференціювання пухлин не впливає на експресію раковими клітинами ER, PR, Ki-67 та МКА-РЕА1,5 та 6. Неопластична тканина має виражену варіабельну експресію МКА-РЕА1,5 та 6, яка не залежить від гормонального статусу неопластичних клітин. При цьому, наявність експресії МКА-РЕА1 має

виражений інгібуючий вплив на проліферативну активність клітин, який може реалізовуватись через низку внутрішньоклітинних посередників.

4. Бактеріальний білок R28, епідеміологічно пов'язаний з вибухами пуерперального сепсису, специфічно взаємодіє з рецептором людини CEACAM1. Ця взаємодія спричинює події, які сприяють розвитку пуерперального сепсису, включаючи адгезію до клітин шийки матки, пригнічення регенерації епітелію та депресію вроджених імунних відповідей. Високороздільний структурний аналіз показав, що домен R28 із складом, подібним до IgI3, зв'язується з N-термінальним доменом CEACAM1. Разом ці відкриття демонструють, що взаємодія адгезин-рецептор може визначати патогенез бактеріального сепсису та надає молекулярні уявлення про патогенез одного з найважливіших інфекційних захворювань в історії медицини.

5. Результати впровадження флуоресцентної візуалізації як допоміжного методу для виявлення раку та метастатичних уражень високого ризику в клінічній практиці продемонстрували вражаючі результати та величезний потенціал. Однак інтраопераційну флуоресцентну візуалізацію слід розглядати не як основний метод діагностики чи лікування, а як допоміжний засіб для хірурга. Таким чином, флуоресцентне дослідження не скасовує золотих стандартів діагностики доброякісних або злоякісних пухлин (традиційне обстеження, біопсія, ультразвукове дослідження та комп'ютерна томографія тощо) і зазвичай може проводитися під час інтраопераційного лікування. Крім того, оскільки флуоресцентна хірургія та методи флуоресцентної діагностики продовжують удосконалюватися, цілком імовірно, що вони еволюціонуватимуть до цільових флуоресцентних візуалізаційних зондів, які все більше будуть націлені на певний тип ракової клітини. Найважливішим моментом залишається пошук високоселективних месенджерів флуоресцентних міток, які дають змогу ідентифікувати пухлинні клітини виключно в уражених органах і вказують хірургам межі їх поширення та метастазування.

ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ

1. Human CEACAM1 splice variants [Internet]. 2018[updated 2018 June 19; cited 2020 Feb 9].
2. Singer B. B. CEACAMs. In book: Encyclopedia of Signaling Molecules. Springer International Publishing, New York; 2016. 1–9 p.
3. Calinescu A., Turcu G., Nedelcu R. I., Brinzea A., Hodoroagea A., Antohe M., Diaconu C., Bleotu C., Pirici D., Jilaveanu L. B., Ion D. A., Badarau I. A. On the Dual Role of Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecule 1 (CEACAM1) in Human Malignancies. *J Immunol Res.* 2018;2018:7169081.
4. Helfrich I., Singer B. B. Size Matters: The Functional Role of the CEACAM1 Isoform Signature and Its Impact for NK Cell-Mediated Killing in Melanoma. *Cancers (Basel).* 2019;11(3):pii: E356.
5. Agenus acquires novel antibodies to immuno-oncology target CEACAM1 [Internet]. 2015 [updated 2015 July 20; cited 2020 Mar 3].
6. Kelleher M., Singh R., O’Driscoll C. M., Melgar S. Carcinoembryonic antigen (CEACAM) family members and Inflammatory Bowel Disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2019;47:21–31.
7. DSouza AV, Lin H, Henderson ER, Samkoe KS, Pogue BW. Review of fluorescence guided surgery systems: identification of key performance capabilities beyond indocyanine green imaging. *J Biomed Opt.* 2016;21(8):80901.
8. Nagaya T, Nakamura YA, Choyke PL, Kobayashi H. Fluorescence-Guided Surgery. *Front Oncol.* 2017;7:314.
9. Barth CW, Gibbs SL. Fluorescence Image-Guided Surgery - a Perspective on Contrast Agent Development. *Proc SPIE Int Soc Opt Eng.* 2020;11222:112220J.
10. Zheng Y, Yang H, Wang H, et al. Fluorescence-guided surgery in cancer treatment: current status and future perspectives. *Ann Transl Med.* 2019;7(Suppl 1):S6.

Перелік літературних джерел до розділу 1

1. Creasman WT, Odicino F, Maisonneuve P, Quinn MA, Beller U, Benedet JL, Heintz A, Ngan H, Pecorelli S. Carcinoma of the Corpus Uteri. *Int J Gynaecol Obstet.* 2006 Nov;95 Suppl 1:S105-S143. doi: 10.1016/S0020-7292(06)60031-3.
2. Kravtsova O.I., Lyndin M.S., Sikora V.V., Hyriavenko N.I., Kuzenko Y.V., Moskalenko R.A., Sikora K.O., Lyndina Y.M., Romaniuk A.M. The role of hsp70 and hsp90 in the endometrial carcinomas progression. *Azerbaijan Medical Journal (ATJ).* 2021;3:136-146.
3. Lytvynenko M, Narbutova T, Vasylyev V, Bondarenko A, Gargin V. Morphofunctional changes in endometrium under the influence of chronic alcoholism. *Georgian Med.* 2021;315:160-164.
4. Romaniuk A, Lyndin M, Smiyanov V, Sikora V, Rieznik A, Kuzenko Y, Budko H, Moskalenko Y, Karpenko L, Sikora V, Gladchenko O. Primary multiple tumor with affection of the thyroid gland, uterus, urinary bladder, mammary gland and other organs. *Pathol Res Pract.* 2017 May;213(5):574-579. doi: 10.1016/j.prp.2017.01.003.
5. Hashemi Goradel N, Najafi M, Salehi E, Farhood B, Mortezaee K. Cyclooxygenase-2 in cancer: A review. *J Cell Physiol.* 2019 May;234(5):5683-5699. doi: 10.1002/jcp.27411.
6. Pannunzio A, Coluccia M. Cyclooxygenase-1 (COX-1) and COX-1 Inhibitors in Cancer: A Review of Oncology and Medicinal Chemistry Literature. *Pharmaceuticals (Basel).* 2018 Oct 11;11(4):101. doi: 10.3390/ph11040101.
7. Li B, Lu Y, Yu L, Han X, Wang H, Mao J, Shen J, Wang B, Tang J, Li C, Song B. miR-221/222 promote cancer stem-like cell properties and tumor growth of breast cancer via targeting PTEN and sustained Akt/NF- κ B/COX-2 activation. *Chem Biol Interact.* 2017 Nov 1;277:33-42. doi: 10.1016/j.cbi.2017.08.014.
8. Hashemi Goradel N, Najafi M, Salehi E, Farhood B, Mortezaee K. Cyclooxygenase-2 in cancer: A review. *J Cell Physiol.* 2019 May;234(5):5683-5699. doi: 10.1002/jcp.27411.

9. Goswami S, Sharma-Walia N. Crosstalk between osteoprotegerin (OPG), fatty acid synthase (FASN) and, cyclooxygenase-2 (COX-2) in breast cancer: implications in carcinogenesis. *Oncotarget*. 2016 Sep 13;7(37):58953-58974. doi: 10.18632/oncotarget.9835.

10. Li F, Zhu YT. HGF-activated colonic fibroblasts mediates carcinogenesis of colonic epithelial cancer cells via PKC-cMET-ERK1/2-COX-2 signaling. *Cell Signal*. 2015 Apr;27(4):860-6. doi: 10.1016/j.cellsig.2015.01.014.

11. Obermoser V, Baecker D, Schuster C, Braun V, Kircher B, Gust R. Chlorinated cobalt alkyne complexes derived from acetylsalicylic acid as new specific antitumor agents. *Dalton Trans*. 2018 Mar 28;47(12):4341-4351. doi: 10.1039/c7dt04790h.

12. Dannenberg AJ, Lippman SM, Mann JR, Subbaramaiah K, DuBois RN. Cyclooxygenase-2 and epidermal growth factor receptor: pharmacologic targets for chemoprevention. *J Clin Oncol*. 2005 Jan 10;23(2):254-66. doi: 10.1200/JCO.2005.09.112.

13. Gurram B, Zhang S, Li M, Li H, Xie Y, Cui H, Du J, Fan J, Wang J, Peng X. Celecoxib Conjugated Fluorescent Probe for Identification and Discrimination of Cyclooxygenase-2 Enzyme in Cancer Cells. *Anal Chem*. 2018 Apr 17;90(8):5187-5193. doi: 10.1021/acs.analchem.7b05337.

14. Esbona K, Yi Y, Saha S, Yu M, Van Doorn RR, Conklin MW, Graham DS, Wisinski KB, Ponik SM, Eliceiri KW, Wilke LG, Keely PJ. The Presence of Cyclooxygenase 2, Tumor-Associated Macrophages, and Collagen Alignment as Prognostic Markers for Invasive Breast Carcinoma Patients. *Am J Pathol*. 2018 Mar;188(3):559-573. doi: 10.1016/j.ajpath.2017.10.025.

15. Greenhough A, Smartt HJ, Moore AE, Roberts HR, Williams AC, Paraskeva C, Kaidi A. The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis*. 2009 Mar;30(3):377-86. doi: 10.1093/carcin/bgp014.

16.Fujimoto J, Toyoki H, Sakaguchi H, Jahan I, Alam SM, Tamaya T. Clinical implications of expression of cyclooxygenase-2 related to angiogenesis in ovarian cancer. *Oncol Rep.* 2006 Jan;15(1):21-5.

17.Hosseini F, Mahdian-Shakib A, Jadidi-Niaragh F, Enderami SE, Mohammadi H, Hemmatzadeh M, Mohammed HA, Anissian A, Kokhaei P, Mirshafiey A, Hassannia H. Anti-inflammatory and anti-tumor effects of α -l-guluronic acid (G2013) on cancer-related inflammation in a murine breast cancer model. *Biomed Pharmacother.* 2018 Feb;98:793-800. doi: 10.1016/j.biopha.2017.12.111.

18.Majumder M, Landman E, Liu L, Hess D, Lala PK. COX-2 Elevates Oncogenic miR-526b in Breast Cancer by EP4 Activation. *Mol Cancer Res.* 2015 Jun;13(6):1022-33. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-14-0543.

19.Krishnamachary B, Stasinopoulos I, Kakkad S, Penet MF, Jacob D, Wildes F, Mironchik Y, Pathak AP, Solaiyappan M, Bhujwalla ZM. Breast cancer cell cyclooxygenase-2 expression alters extracellular matrix structure and function and numbers of cancer associated fibroblasts. *Oncotarget.* 2017 Mar 14;8(11):17981-17994. doi: 10.18632/oncotarget.14912.

20.Xu Y, Yang X, Wang T, Yang L, He YY, Miskimins K, Qian SY. Knockdown delta-5-desaturase in breast cancer cells that overexpress COX-2 results in inhibition of growth, migration and invasion via a dihomo- γ -linolenic acid peroxidation dependent mechanism. *BMC Cancer.* 2018 Mar 27;18(1):330. doi: 10.1186/s12885-018-4250-8.

21.Miao J, Lu X, Hu Y, Piao C, Wu X, Liu X, Huang C, Wang Y, Li D, Liu J. Prostaglandin E2 and PD-1 mediated inhibition of antitumor CTL responses in the human tumor microenvironment. *Oncotarget.* 2017 Sep 22;8(52):89802-89810. doi: 10.18632/oncotarget.21155.

22.Chin YT, Wei PL, Ho Y, Nana AW, Changou CA, Chen YR, Yang YS, Hsieh MT, Hercbergs A, Davis PJ, Shih YJ, Lin HY. Thyroxine inhibits resveratrol-caused apoptosis by PD-L1 in ovarian cancer cells. *Endocr Relat Cancer.* 2018 May;25(5):533-545. doi: 10.1530/ERC-17-0376.

23.Noda M, Tatsumi Y, Tomizawa M, Takama T, Mitsufuji S, Sugihara H, Kashima K, Hattori T. Effects of etodolac, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, on the expression of E-cadherin-catenin complexes in gastrointestinal cell lines. *J Gastroenterol.* 2002;37(11):896-904. doi: 10.1007/s005350200151.

24.Ohtsuka J, Oshima H, Ezawa I, Abe R, Oshima M, Ohki R. Functional loss of p53 cooperates with the in vivo microenvironment to promote malignant progression of gastric cancers. *Sci Rep.* 2018 Feb 2;8(1):2291. doi: 10.1038/s41598-018-20572-1.

25.Hull MA, Cuthbert RJ, Ko CWS, Scott DJ, Cartwright EJ, Hawcroft G, Perry SL, Ingram N, Carr IM, Markham AF, Bonifer C, Coletta PL. Paracrine cyclooxygenase-2 activity by macrophages drives colorectal adenoma progression in the Apc Min/+ mouse model of intestinal tumorigenesis. *Sci Rep.* 2017 Jul 20;7(1):6074. doi: 10.1038/s41598-017-06253-5.

26.Lin HY, Hsieh MT, Cheng GY, Lai HY, Chin YT, Shih YJ, Nana AW, Lin SY, Yang YSH, Tang HY, Chiang IJ, Wang K. Mechanisms of action of nonpeptide hormones on resveratrol-induced antiproliferation of cancer cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2017 Sep;1403(1):92-100. doi: 10.1111/nyas.13423.

27.Xu Z, Choudhary S, Voznesensky O, Mehrotra M, Woodard M, Hansen M, Herschman H, Pilbeam C. Overexpression of COX-2 in human osteosarcoma cells decreases proliferation and increases apoptosis. *Cancer Res.* 2006 Jul 1;66(13):6657-64. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3624.

28.Hinz B, Ramer R, Eichele K, Weinzierl U, Brune K. Up-regulation of cyclooxygenase-2 expression is involved in R(+)-methanandamide-induced apoptotic death of human neuroglioma cells. *Mol Pharmacol.* 2004 Dec;66(6):1643-51. doi: 10.1124/mol.104.002618.

29.Uotila PJ, Erkkola RU, Klemi PJ. The expression of cyclooxygenase-1 and -2 in proliferative endometrium and endometrial adenocarcinoma. *Ann Med.* 2002;34(6):428–433. doi: 10.1080/078538902321012379.

30. Ohno S, Ohno Y, Suzuki N, Inagawa H, Kohchi C, Soma G, Inoue M. Multiple roles of cyclooxygenase-2 in endometrial cancer. *Anticancer Res.* 2005 Nov-Dec;25(6A):3679-87.

31. Mitacek MCG, Praderio RG, Stornelli MC, de la Sota RL, Stornelli MA. Endometritis in the bitch: Immunohistochemical localization of cyclooxygenase 2. *Open Vet J.* 2020 Aug;10(2):157-163. doi: 10.4314/ovj.v10i2.5.

32. Ye Y, Wang X, Jeschke U, von Schönfeldt V. COX-2-PGE2-EPs in gynecological cancers. *Arch Gynecol Obstet.* 2020 Jun;301(6):1365-1375. doi: 10.1007/s00404-020-05559-6.

33. Ohno S, Ohno Y, Suzuki N, Inagawa H, Kohchi C, Soma G, Inoue M. Multiple roles of cyclooxygenase-2 in endometrial cancer. *Anticancer Res.* 2005;25(6A):3679–3687.

34. Deng L, Liang H, Han Y. Cyclooxygenase-2 and β -Catenin as Potential Diagnostic and Prognostic Markers in Endometrial Cancer. *Front Oncol.* 2020 Feb 21;10:56. doi: 10.3389/fonc.2020.00056.

35. Liu Y, Li H, Zhao C, Jia H. MicroRNA-101 inhibits angiogenesis via COX-2 in endometrial carcinoma. *Mol Cell Biochem.* 2018 Nov;448(1-2):61-69. doi: 10.1007/s11010-018-3313-0.

36. Kosmas K, Mitropoulou G, Stamoulas M, Marouga A. Expression of cyclooxygenase-2 in imprint smears of endometrial carcinoma. *Diagn Cytopathol.* 2020 Nov;48(11):1086-1092. doi: 10.1002/dc.24481.

37. Li M, Li M, Wei Y, Xu H. Prognostic and Clinical Significance of Cyclooxygenase-2 Overexpression in Endometrial Cancer: A Meta-Analysis. *Front Oncol.* 2020 Aug 6;10:1202. doi: 10.3389/fonc.2020.01202.

38. Jarzabek K, Koda M, Walentowicz-Sadlecka M, Grabiec M, Laudanski P, Wolczynski S. Altered expression of ERs, aromatase, and COX2 connected to estrogen action in type 1 endometrial cancer biology. *Tumour Biol.* 2013 Dec;34(6):4007-16. doi: 10.1007/s13277-013-0991-9.

39. Faloppa CC, Baiocchi G, Cunha IW, Fregnani JH, Osorio CA, Fukazawa EM, Kumagai LY, Badiglian-Filho L, Pinto GL, Soares FA. NF- κ B and COX-2

expression in nonmalignant endometrial lesions and cancer. *Am J Clin Pathol*. 2014 Feb;141(2):196-203. doi: 10.1309/AJCPV7U7PGHOWEQG.

40.Brizzolara A, Benelli R, Venè R, Barboro P, Poggi A, Tosetti F, Ferrari N. The ErbB family and androgen receptor signaling are targets of Celecoxib in prostate cancer. *Cancer Lett*. 2017 Aug 1;400:9-17. doi: 10.1016/j.canlet.2017.04.025.

41.Hull MA, Cuthbert RJ, Ko CWS, Scott DJ, Cartwright EJ, Hawcroft G, Perry SL, Ingram N, Carr IM, Markham AF, Bonifer C, Coletta PL. Paracrine cyclooxygenase-2 activity by macrophages drives colorectal adenoma progression in the *Apc Min/+* mouse model of intestinal tumorigenesis. *Sci Rep*. 2017 Jul 20;7(1):6074. doi: 10.1038/s41598-017-06253-5.

42.Romaniuk A, Gyryavenko N, Lyndin M, Piddubnyi A, Sikora V, Korobchanska A. Primary cancer of the fallopian tubes: histological and immunohistochemical features. *Folia Med Cracov*. 2016;56(4):71-80.

43.Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington CS, Young RH. (Eds.): WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs. France: International Agency for Research on Cancer; 2014. 307 p.

44.Sung H, Ferlay J, Siegel RL, 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 May;71(3):209-249.

45.Romaniuk A, Lyndin M, Moskalenko R, Kuzenko Y, Gladchenko O, Lyndina Y. Pathogenetic mechanisms of heavy metals effect on proapoptotic and proliferative potential of breast cancer. *Interv Med Appl Sci*. 2015 Jun;7(2):63-8. doi: 10.1556/1646.7.2015.2.4.

46.Lytvynenko MV, Narbutova TY, Vasylyev VV, Gargin VV. Indicators of proliferative activity of endometrium in women with immunodeficiency. *AMJ*. 2021;2:53-60.

47.Lytvynenko MV, Gargin VV. Triple-negative transformation of the endometrium, cervix and mammary gland on the background of immunodeficiency. *Med. Perspekt*. 2022;27(2):119-124.

48. Na TY, Schecterson L, Mendonsa AM, Gumbiner BM. The functional activity of E-cadherin controls tumor cell metastasis at multiple steps. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(11):5931-5937. doi:10.1073/pnas.1918167117

49. Benchimol S., Fuks A., Jothy S., Beauchemin N., Shirota K., Stanners C. P. Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule. *Cell*. 1989;57(2):327–34.

50. Hammarstrom S. The carcinoembryonic antigen (CEA) family: Structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Semin Cancer Biol*. 1999;9(2):67–81.

51. Hoffmann C., Berking A., Agerer F., Buntru A., Neske F., Chhatwal G. S., Ohlsen K., Hauck C. R. Caveolin limits membrane microdomain mobility and integrin-mediated uptake of fibronectin-binding pathogens. *J Cell Sci*. 2010;123(Pt 24):4280–91.

52. Liu J., Di G., Wu C. T., Hu X., Duan H. CEACAM1 inhibits cell-matrix adhesion and promotes cell migration through regulating the expression of N-cadherin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;430(2):598–603.

53. Liu Q., Yang Y. M., Zhang Q. H., Zhang T. G., Zhou Q., Zhou C. J. Inhibitor of differentiation is overexpressed with progression of benign to malignant lesions and related with carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 distribution in mammary glands. *Ann Diagn Pathol*. 2011;15(1):30–6.

54. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018 Nov;68(6):394-424. DOI: 10.3322/caac.21492.

55. Schiller JT, Lowy DR. Understanding and learning from the success of prophylactic human papillomavirus vaccines. *Nat Rev Microbiol*. 2012;10(10):681-692. DOI: 10.1038/nrmicro2872.

56. Smith JS, Green J, Berrington de Gonzalez A, Appleby P, Peto J, Plummer M, et al. Cervical cancer and use of hormonal contraceptives: a systematic review. *Lancet*. 2003;361(9364):1159-1167. DOI: 10.1016/s0140-6736 (03)12949-2.

57.Castellsagué X, Bosch FX, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV, de Sanjose S, et al. Male circumcision, penile human papillomavirus infection, and cervical cancer in female partners. *N Engl J Med.* 2002;346(15):1105-1112. DOI: 10.1056/NEJMoa011688.

58.Hull R, Mbele M, Makhafola T, Hicks C, Wang SM, Reis RM, et al. Cervical cancer in low and middle-income countries. *Oncol Lett.* 2020;20(3):2058-2074. DOI: 10.3892/ol.2020.11754.

59.Rose PG, Ali S, Watkins E, Thigpen JT, Deppe G, Clarke-Pearson DL, et al. Long-term follow-up of a randomized trial comparing concurrent single agent cisplatin, cisplatin-based combination chemotherapy, or hydroxyurea during pelvic irradiation for locally advanced cervical cancer: a Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol.* 2007;25(19):2804-2810. DOI: 10.1200/JCO.2006.09.4532.

60.Setiawan VW, Yang HP, Pike MC, McCann SE, Yu H, Xiang YB, et al. Type I and II endometrial cancers: have they different risk factors? *J Clin Oncol.* 2013 Jul 10;31(20):2607-18. DOI: 10.1200/JCO.2012.48.2596.

61.Liu Z, Shi H. Prognostic Role of Squamous Cell Carcinoma Antigen in Cervical Cancer: A Meta-analysis. *Dis Markers.* 2019;2019:6710352. DOI: 10.1155/2019/6710352.

Перелік літературних джерел до розділу 2

1. Cohen J, et al. Sepsis: a roadmap for future research. *Lancet Infect Dis.* 2015;15:581-614. doi: 10.1016/S1473-3099(15)70112-X

2. Say L, et al. Global causes of maternal death: a WHO systematic analysis. *Lancet Glob Health.* 2014;2:e323-e333. doi: 10.1016/S2214-109X(14)70227-X

3. Holmes O. The contagiousness of puerperal fever. *N Engl J Med.* 1843;1:503-530.

4. Semmelweis IP. Die Aetiologie, der Begriff und die Prophylaxis des Kindbettfiebers. University of Wisconsin Press; 1983.

5. Colebrook L. The story of puerperal fever-1800 to 1950. *Br Med J.* 1956;4:247-252.

6. Lancefield RC, Hare R. The serological differentiation of pathogenic and non-pathogenic strains of hemolytic streptococci from parturient women. *J Exp Med.* 1935;61:335-349.
7. Lancefield R, Perlmann G. Preparation and properties of a protein (R antigen) occurring in streptococci of group A, type 28 and in certain streptococci of other serological groups. *J Exp Med.* 1952;96:83-97.
8. Colman G, Tanna A, Efstratiou A, Gaworzewska ET. The serotypes of *Streptococcus pyogenes* present in Britain during 1980-1990 and their association with disease. *J Med Microbiol.* 1993;39:165-178.
9. Stålhammar-Carlemalm M, Areschoug T, Larsson C, Lindahl G. The R28 protein of *Streptococcus pyogenes* is related to several group B streptococcal surface proteins, confers protective immunity and promotes binding to human epithelial cells. *Mol Microbiol.* 1999;33:208-219.
10. Golińska E, et al. Virulence factors of *Streptococcus pyogenes* strains from women in peri-labor with invasive infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2016;35:747-754.
11. Chuang I, Beneden C van, Beall B, Schuchat A. Population-based surveillance for postpartum invasive group A *Streptococcus* infections, 1995-2000. *Clin Infect Dis.* 2002;35:665-670.
12. Deutscher M, et al. Incidence and severity of invasive *Streptococcus pneumoniae*, group A *Streptococcus*, and group B *Streptococcus* infections among pregnant and postpartum women. *Clin Infect Dis.* 2011;53:114-123.
13. Chochua S, et al. Population and whole genome sequence-based characterization of invasive group A streptococci recovered in the United States during 2015. *mBio.* 2017;8:e01422-17.
14. Luca-Harari B, et al. Clinical and epidemiological aspects of invasive *Streptococcus pyogenes* infections in Denmark during 2003 and 2004. *J Clin Microbiol.* 2008;46:79-86.
15. Gaworzewska E, Colman G. Changes in the pattern of infection caused by *Streptococcus pyogenes*. *Epidemiol Infect.* 1988;100:257-269.

16. Donders G, et al. Genital tract GAS infection ISIDOG guidelines. *J Clin Med*. 2021;10:2043.
17. van Sorge NM, et al. Bacterial protein domains with a novel Ig-like fold target human CEACAM receptors. *EMBO J*. 2021;40:e106103.
18. Gray-Owen SD, Blumberg RS. CEACAM1: contact-dependent control of immunity. *Nat Rev Immunol*. 2006;6:433-446.
19. Slevogt H, et al. CEACAM1 inhibits Toll-like receptor 2-triggered antibacterial responses of human pulmonary epithelial cells. *Nat Immunol*. 2008;9:1270-1278.
20. Lu R, Pan H, Shively JE. CEACAM1 negatively regulates IL-1 β production in LPS-activated neutrophils by recruiting SHP-1 to a SYK-TLR4-CEACAM1 complex. *PLoS Pathog*. 2012;8:e1002597.
21. Weckel A, et al. The N-terminal domain of the R28 protein promotes emm28 group A Streptococcus adhesion to host cells via direct binding to three integrins. *J Biol Chem*. 2018;293:16006-16018.
22. Javaheri A, et al. Helicobacter pylori adhesin HopQ engages in a virulence-enhancing interaction with human CEACAMs. *Nat Microbiol*. 2016;2:16189.
23. Green NM, et al. Genome sequence of a serotype M28 strain of group A Streptococcus: potential new insights into puerperal sepsis and bacterial disease specificity. *J Infect Dis*. 2005;192:760-770.
24. Sitkiewicz I, et al. Lateral gene transfer of streptococcal ICE element RD2 (region of difference 2) encoding secreted proteins. *BMC Microbiol*. 2011;11:65.
25. Eraso JM, et al. Genetic heterogeneity of the Spy1336/R28—Spy1337 virulence axis in Streptococcus pyogenes and effect on gene transcript levels and pathogenesis. *PLoS ONE*. 2020;15:e0229064.
26. Moonens K, et al. Helicobacter pylori adhesin HopQ disrupts trans dimerization in human CEACAMs. *EMBO J*. 2018;37:e98665.
27. Zhu L, et al. Genome-wide screens identify group A Streptococcus surface proteins promoting female genital tract colonization and virulence. *Am J Pathol*. 2020;190:862-873.

28. Islam EA, et al. Specific binding to differentially expressed human carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules determines the outcome of *Neisseria gonorrhoeae* infections along the female reproductive tract. *Infect Immun*. 2018;86:e00092-18.

29. Swanson KV, et al. CEACAM is not necessary for *Neisseria gonorrhoeae* to adhere to and invade female genital epithelial cells. *Cell Microbiol*. 2001;3:681-691.

30. Jonkman JEN, et al. An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy. *Cell Adh Migr*. 2014;8:440-451.

31. Yang C, et al. Inhibition of cell invasion and migration by CEACAM1-4S in breast cancer. *Oncol Lett*. 2017;14:4758-4766.

32. Leblanc S, et al. CEACAM1 deficiency delays important wound healing processes. *Wound Repair Regen*. 2011;19:745-752.

33. Hayashi S, Osada Y, Miura K, Simizu S. Cell-dependent regulation of vasculogenic mimicry by carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 1 (CEACAM1). *Biochem Biophys Res Commun*. 2020;511:100734.

34. Fox JM, et al. Methodology for reliable and reproducible cryopreservation of human cervical tissue. *Cryobiology*. 2017;77:14-18.

35. Fischetti VA. Streptococcal M protein: molecular design and biological behavior. *Clin Microbiol Rev*. 1989;2:285-314.

36. Carlsson F, Berggård K, Stålhammar-Carlemalm M, Lindahl G. Evasion of phagocytosis through cooperation between two ligand-binding regions in *Streptococcus pyogenes* M protein. *J Exp Med*. 2003;198:1057-1068.

37. Schmitter T, Agerer F, Peterson L, Münzner P, Hauck CR. Granulocyte CEACAM3 is a phagocytic receptor of the innate immune system that mediates recognition and elimination of human-specific pathogens. *J Exp Med*. 2004;199:35-46.

38. Bonsignore P, Kuiper JWP, Adrian J, Goob G, Hauck CR. CEACAM3—a prim(at)e invention for opsonin-independent phagocytosis of bacteria. *Front Immunol*. 2020;10:3160.

39. Boulton IC, Gray-Owen SD. Neisserial binding to CEACAM1 arrests the activation and proliferation of CD4⁺ T lymphocytes. *Nat Immunol.* 2002;3:229-236.
40. Cole JN, Barnett TC, Nizet V, Walker MJ. Molecular insight into invasive group A streptococcal disease. *Nat Rev Microbiol.* 2011;9:724-736.
41. Walker MJ, et al. Disease manifestations and pathogenic mechanisms of group A Streptococcus. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27:264-301.
42. Bonsor DA, et al. The Helicobacter pylori adhesin protein HopQ exploits the dimer interface of human CEACAMs to facilitate translocation of the oncoprotein CagA. *EMBO J.* 2018;37:e98664.
43. Connors R, et al. The Moraxella adhesin UspA1 binds to its human CEACAM1 receptor by a deformable trimeric coiled-coil. *EMBO J.* 2008;27:1779-1789.
44. Villullas S, Hill DJ, Sessions RB, Rea J, Virji M. Mutational analysis of human CEACAM1: The potential of receptor polymorphism in increasing host susceptibility to bacterial infection. *Cell Microbiol.* 2007;9:329-346.
45. Virji M, et al. Critical determinants of host receptor targeting by Neisseria meningitidis and Neisseria gonorrhoeae: identification of Opa adhesiotopes on the N-domain of CD66 molecules. *Mol Microbiol.* 1999;34:538-551.
46. Berger C, Billker O, Meyer TF, Servin AL, Kansau I. Differential recognition of members of the carcinoembryonic antigen family by Afa/Dr adhesins of diffusely adhering Escherichia coli (Afa/Dr DAEC). *Mol Microbiol.* 2004;52:963-983.
47. Tchoupa AK, Schuhmacher T, Hauck CR. Signaling by epithelial members of the CEACAM family—Mucosal docking sites for pathogenic bacteria. *Cell Commun Signal.* 2014;12:27.
48. Ambrosi C, et al. Acinetobacter baumannii targets human carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules (CEACAMs) for invasion of pneumocytes. *mSystems.* 2020;5:e00604-20.
49. Muenzner P, Bachmann V, Kuespert K, Hauck CR. The CEACAM1 transmembrane domain, but not the cytoplasmic domain, directs internalization of

human pathogens via membrane microdomains. *Cell Microbiol.* 2008;10:1074-1092.

50.Voyich JM, Musser JM, DeLeo FR. *Streptococcus pyogenes* and human neutrophils: a paradigm for evasion of innate host defense by bacterial pathogens. *Microbes Infect.* 2004;6:1117-1123.

51.Brewer ML, et al. *Fusobacterium* spp. target human CEACAM1 via the trimeric autotransporter adhesin CbpF. *J Oral Microbiol.* 2019;11:1565043.

52.Zhao Q, et al. Integrin but not CEACAM receptors are dispensable for *Helicobacter pylori* CagA translocation. *PLoS Pathog.* 2018;14:e1007359.

53.Voges M, Bachmann V, Kammerer R, Gophna U, Hauck CR. CEACAM1 recognition by bacterial pathogens is species-specific. *BMC Microbiol.* 2010;10:117.

54.Benenson S, Mankuta D, Gross I, Schwartz C. Cluster of puerperal fever in an obstetric ward: a reminder of Ignaz Semmelweis. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2015;36:1488-1490.

55.Jespersen MG, Lacey JA, Tong SYC, Davies MR. Global genomic epidemiology of *Streptococcus pyogenes*. *Infect Genet Evol.* 2020;86:104609.

56.Mead PB, Winn WC. Vaginal-rectal colonization with group A streptococci in late pregnancy. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2000;8:217-219.

Перелік літературних джерел до розділу 3

1. Javidfar J, Speicher PJ, Hartwig MG, D'Amico TA, Berry MF. Impact of Positive Margins on Survival in Patients Undergoing Esophagogastrectomy for Esophageal Cancer. *Ann Thorac Surg.* 2016 Mar;101(3):1060-7. doi: 10.1016/j.athoracsur.2015.09.005.

2. Tomo S, de Arruda JAA, Cabral FS, Nunez SC, Simonato LE. Fluorescence visualization as an auxiliary method to detect oral potentially malignant disorders and oral cancer. *Transl Cancer Res.* 2022 Aug;11(8):2477-2479. doi: 10.21037/tcr-22-1874.

3. Tringale KR, Pang J, Nguyen QT. Image-guided surgery in cancer: A strategy to reduce incidence of positive surgical margins. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2018 May;10(3):e1412. doi: 10.1002/wsbm.1412.
4. Ratnavelu ND, Brown AP, Mallett S, Scholten RJ, Patel A, Founta C, Galaal K, Cross P, Naik R. Intraoperative frozen section analysis for the diagnosis of early stage ovarian cancer in suspicious pelvic masses. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016 Mar 1;3(3):CD010360. doi: 10.1002/14651858.CD010360.pub2.
5. Kung FY, Tsang AK, Yu EL. Intraoperative frozen section analysis of ovarian tumors: a 11-year review of accuracy with clinicopathological correlation in a Hong Kong Regional hospital. *Int J Gynecol Cancer*. 2019 May;29(4):772-778. doi: 10.1136/ijgc-2018-000048.
6. Yoshida H, Tanaka H, Tsukada T, Abeto N, Kobayashi-Kato M, Tanase Y, Uno M, Ishikawa M, Kato T. Diagnostic Discordance in Intraoperative Frozen Section Diagnosis of Ovarian Tumors: A Literature Review and Analysis of 871 Cases Treated at a Japanese Cancer Center. *Int J Surg Pathol*. 2021 Feb;29(1):30-38. doi: 10.1177/1066896920960518.
7. Thurber GM, Figueiredo JL, Weissleder R. Detection limits of intraoperative near infrared imaging for tumor resection. *J Surg Oncol*. 2010 Dec 1;102(7):758-64. doi: 10.1002/jso.21735.
8. Lwin TM, Hoffman RM, Bouvet M. Unique Benefits of Tumor-Specific Nanobodies for Fluorescence Guided Surgery. *Biomolecules*. 2021 Feb 18;11(2):311. doi: 10.3390/biom11020311.
9. Pischik VG, Kovalenko A. The role of indocyanine green fluorescence for intersegmental plane identification during video-assisted thoracoscopic surgery segmentectomies. *J Thorac Dis*. 2018 Nov;10(Suppl 31):S3704-S3711. doi: 10.21037/jtd.2018.04.84.
10. Muyskens M. The Fluorescence of Lignum nephriticum: A Flash Back to the Past and a Simple Demonstration of Natural Substance Fluorescence; Ed Vitz. *Journal of Chemical Education*. 2006;83(5):765. doi: 10.1021/ed083p765

11. Liu G, Zhao Y. Switching between Phosphorescence and Fluorescence Controlled by Chiral Self-Assembly. *Adv Sci (Weinh)*. 2017 May 15;4(9):1700021. doi: 10.1002/advs.201700021.
12. Acuña AU, Amat-Guerri F, Morcillo P, Liras M, Rodríguez B. Structure and formation of the fluorescent compound of *Lignum nephriticum*. *Org Lett*. 2009 Jul 16;11(14):3020-3. doi: 10.1021/ol901022g.
13. Debie P, Hernot S. Emerging Fluorescent Molecular Tracers to Guide Intra-Operative Surgical Decision-Making. *Front Pharmacol*. 2019 May 14;10:510. doi: 10.3389/fphar.2019.00510.
14. Rijpkema M, Bos DL, Cornelissen AS, Franssen GM, Goldenberg DM, Oyen WJ, Boerman OC. Optimization of Dual-Labeled Antibodies for Targeted Intraoperative Imaging of Tumors. *Mol Imaging*. 2015;14:348-55. doi: 10.2310/7290.2015.00015
15. Troyan SL, Kianzad V, Gibbs-Strauss SL, Gioux S, Matsui A, Oketokoun R, Ngo L, Khamene A, Azar F, Frangioni JV. The FLARE intraoperative near-infrared fluorescence imaging system: a first-in-human clinical trial in breast cancer sentinel lymph node mapping. *Ann Surg Oncol*. 2009 Oct;16(10):2943-52. doi: 10.1245/s10434-009-0594-2.
16. Brouwer OR, Buckle T, Vermeeren L, Klop WM, Balm AJ, van der Poel HG, van Rhijn BW, Horenblas S, Nieweg OE, van Leeuwen FW, Valdés Olmos RA. Comparing the hybrid fluorescent-radioactive tracer indocyanine green-99mTc-nanocolloid with 99mTc-nanocolloid for sentinel node identification: a validation study using lymphoscintigraphy and SPECT/CT. *J Nucl Med*. 2012 Jul;53(7):1034-40. doi: 10.2967/jnumed.112.103127.
17. Hernandez Vargas S, Ghosh SC, Azhdarinia A. New Developments in Dual-Labeled Molecular Imaging Agents. *J Nucl Med*. 2019 Apr;60(4):459-465. doi: 10.2967/jnumed.118.213488.
18. Luker GD, Luker KE. Optical imaging: current applications and future directions. *J Nucl Med*. 2008;49:1–4. doi: 10.2967/jnumed.107.045799

19. Cohen R, Stammes MA, de Roos IH, Stigter-van Walsum M, Visser GW, van Dongen GA. Inert coupling of IRDye800CW to monoclonal antibodies for clinical optical imaging of tumor targets. *EJNMMI Res*. 2011 Dec 1;1(1):31. doi: 10.1186/2191-219X-1-31.

20. van Dam GM, Themelis G, Crane LM, Harlaar NJ, Pleijhuis RG, Kelder W, Sarantopoulos A, de Jong JS, Arts HJ, van der Zee AG, Bart J, Low PS, Ntziachristos V. Intraoperative tumor-specific fluorescence imaging in ovarian cancer by folate receptor- α targeting: first in-human results. *Nat Med*. 2011 Sep 18;17(10):1315-9. doi: 10.1038/nm.2472.

21. Lese I, Leckenby JI, Taddeo A, Constantinescu M, Olariu R. Lymph node identification in skin malignancy using indocyanine green transcutaneously study: Study protocol for a diagnostic accuracy study. *Medicine (Baltimore)*. 2019 Nov;98(44):e17839. doi: 10.1097/MD.00000000000017839.

22. Teramoto Y, Nakamura Y, Asami Y, Matsuya T, Brinker TJ, Jansen P, Schulz A, Stoffels I, Klode J, Schadendorf D, Yamamoto A. Intraoperative use of LIGHTVISION: a novel fluorescence navigation system using indocyanine green for sentinel lymph node biopsy in skin cancer patients. *Eur J Dermatol*. 2018 Aug 1;28(4):532-534. doi: 10.1684/ejd.2018.3308.

23. Morton DL, Cochran AJ, Thompson JF, Elashoff R, Essner R, Glass EC, Mozzillo N, Nieweg OE, Roses DF, Hoekstra HJ, Karakousis CP, Reintgen DS, Coventry BJ, Wang HJ; Multicenter Selective Lymphadenectomy Trial Group. Sentinel node biopsy for early-stage melanoma: accuracy and morbidity in MSLT-I, an international multicenter trial. *Ann Surg*. 2005 Sep;242(3):302-11; discussion 311-3. doi: 10.1097/01.sla.0000181092.50141.fa.

24. Nakamura Y, Fujisawa Y, Nakamura Y, Maruyama H, Furuta J, Kawachi Y, Otsuka F. Improvement of the sentinel lymph node detection rate of cervical sentinel lymph node biopsy using real-time fluorescence navigation with indocyanine green in head and neck skin cancer. *J Dermatol*. 2013 Jun;40(6):453-7. doi: 10.1111/1346-8138.12158.

25. Namikawa K, Yamazaki N. Sentinel lymph node biopsy guided by indocyanine green fluorescence for cutaneous melanoma. *Eur J Dermatol*. 2011 Mar-Apr;21(2):184-90. doi: 10.1684/ejd.2010.1237.
26. Boni L, David G, Mangano A, Dionigi G, Rausei S, Spampatti S, Cassinotti E, Fingerhut A. Clinical applications of indocyanine green (ICG) enhanced fluorescence in laparoscopic surgery. *Surg Endosc*. 2015 Jul;29(7):2046-55. doi: 10.1007/s00464-014-3895-x.
27. Diana M, Liu YY, Pop R, Kong SH, Legnèr A, Beaujeux R, Pessaux P, Soler L, Mutter D, Dallemagne B, Marescaux J. Superselective intra-arterial hepatic injection of indocyanine green (ICG) for fluorescence image-guided segmental positive staining: experimental proof of the concept. *Surg Endosc*. 2017 Mar;31(3):1451-1460. doi: 10.1007/s00464-016-5136-y.
28. Solórzano CC, Thomas G, Berber E, Wang TS, Randolph GW, Duh QY, Triponez F. Current state of intraoperative use of near infrared fluorescence for parathyroid identification and preservation. *Surgery*. 2021 Apr;169(4):868-878. doi: 10.1016/j.surg.2020.09.014.
29. Moody ED, Viskari PJ, Colyer CL. Non-covalent labeling of human serum albumin with indocyanine green: a study by capillary electrophoresis with diode laser-induced fluorescence detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1999 Jun 11;729(1-2):55-64. doi: 10.1016/s0378-4347(99)00121-8.
30. Ogawa M, Kosaka N, Choyke PL, Kobayashi H. In vivo molecular imaging of cancer with a quenching near-infrared fluorescent probe using conjugates of monoclonal antibodies and indocyanine green. *Cancer Res*. 2009 Feb 15;69(4):1268-72. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3116.
31. Sabapathy V, Mentam J, Jacob PM, Kumar S. Noninvasive Optical Imaging and In Vivo Cell Tracking of Indocyanine Green Labeled Human Stem Cells Transplanted at Superficial or In-Depth Tissue of SCID Mice. *Stem Cells Int*. 2015;2015:606415. doi: 10.1155/2015/606415.
32. de Graaf W, Häusler S, Heger M, van Ginhoven TM, van Cappellen G, Bennink RJ, Kullak-Ublick GA, Hesselmann R, van Gulik TM, Stieger B.

Transporters involved in the hepatic uptake of (99m)Tc-mebrofenin and indocyanine green. *J Hepatol.* 2011 Apr;54(4):738-45. doi: 10.1016/j.jhep.2010.07.047.

33. Huang L, Vore M. Multidrug resistance p-glycoprotein 2 is essential for the biliary excretion of indocyanine green. *Drug Metab Dispos.* 2001 May;29(5):634-7. PMID: 11302927.

34. Halilbasic E, Claudel T, Trauner M. Bile acid transporters and regulatory nuclear receptors in the liver and beyond. *J Hepatol.* 2013 Jan;58(1):155-68. doi: 10.1016/j.jhep.2012.08.002.

35. Leung N, Furniss D, Giele H. Modern surgical management of breast cancer therapy related upper limb and breast lymphoedema. *Maturitas.* 2015 Apr;80(4):384-90. doi: 10.1016/j.maturitas.2015.01.012.

36. Polom W, Markuszewski M, Rho YS, Matuszewski M. Usage of invisible near infrared light (NIR) fluorescence with indocyanine green (ICG) and methylene blue (MB) in urological oncology. Part 1. *Cent European J Urol.* 2014;67(2):142-8. doi: 10.5173/ceju.2014.02.art5.

37. Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, Reulen HJ; ALA-Glioma Study Group. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol.* 2006 May;7(5):392-401. doi: 10.1016/S1470-2045(06)70665-9.

38. Shimizu S, Kamiike W, Hatanaka N, Yoshida Y, Tagawa K, Miyata M, Matsuda H. New method for measuring ICG Rmax with a clearance meter. *World J Surg.* 1995 Jan-Feb;19(1):113-8; discussion 118. doi: 10.1007/BF00316992.

39. Ginimuge PR, Jyothi SD. Methylene blue: revisited. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol.* 2010 Oct;26(4):517-20. PMID: 21547182

40. De Leeuw F, Breuskin I, Abbaci M, Casiraghi O, Mirghani H, Ben Lakhdar A, Laplace-Builhé C, Hartl D. Intraoperative Near-infrared Imaging for Parathyroid Gland Identification by Auto-fluorescence: A Feasibility Study. *World J Surg.* 2016 Sep;40(9):2131-8. doi: 10.1007/s00268-016-3571-5.

41. Zhang C, Jiang D, Huang B, Wang C, Zhao L, Xie X, Zhang Z, Wang K, Tian J, Luo Y. Methylene Blue-Based Near-Infrared Fluorescence Imaging for Breast Cancer Visualization in Resected Human Tissues. *Technol Cancer Res Treat*. 2019 Jan-Dec;18:1533033819894331. doi: 10.1177/1533033819894331.
42. Jiang L, Liu T, Wang X, Li J, Zhao H. Real-time near-infrared fluorescence imaging mediated by blue dye in breast cancer patients. *J Surg Oncol*. 2020 May;121(6):964-966. doi: 10.1002/jso.25874.
43. Hariharan U, Sood R, Choudhury A, Garg R, Kaur J. Oxygen desaturation following methylene blue injection: Not always spurious. *Saudi J Anaesth*. 2011 Jan;5(1):113-4. doi: 10.4103/1658-354X.76471.
44. Patel HP, Chadwick DR, Harrison BJ, Balasubramanian SP. Systematic review of intravenous methylene blue in parathyroid surgery. *Br J Surg*. 2012 Oct;99(10):1345-51. doi: 10.1002/bjs.8814.
45. Vutskits L, Briner A, Klauser P, Gascon E, Dayer AG, Kiss JZ, Muller D, Licker MJ, Morel DR. Adverse effects of methylene blue on the central nervous system. *Anesthesiology*. 2008 Apr;108(4):684-92. doi: 10.1097/ALN.0b013e3181684be4.
46. Hillary SL, Guillermet S, Brown NJ, Balasubramanian SP. Use of methylene blue and near-infrared fluorescence in thyroid and parathyroid surgery. *Langenbecks Arch Surg*. 2018 Feb;403(1):111-118. doi: 10.1007/s00423-017-1641-2.
47. Matsui A, Tanaka E, Choi HS, Kianzad V, Gioux S, Lomnes SJ, Frangioni JV. Real-time, near-infrared, fluorescence-guided identification of the ureters using methylene blue. *Surgery*. 2010 Jul;148(1):78-86. doi: 10.1016/j.surg.2009.12.003.
48. Bach KK, Lindsay FW, Berg LS, Howard RS. Prolonged postoperative disorientation after methylene blue infusion during parathyroidectomy. *Anesth Analg*. 2004 Nov;99(5):1573-1574. doi: 10.1213/01.ANE.0000134860.73875.CF.
49. Majithia A, Stearns MP. Methylene blue toxicity following infusion to localize parathyroid adenoma. *J Laryngol Otol*. 2006 Feb;120(2):138-40. doi: 10.1017/S0022215105005098.

50. Winer JH, Choi HS, Gibbs-Strauss SL, Ashitate Y, Colson YL, Frangioni JV. Intraoperative localization of insulinoma and normal pancreas using invisible near-infrared fluorescent light. *Ann Surg Oncol*. 2010 Apr;17(4):1094-100. doi: 10.1245/s10434-009-0868-8.

51. Handgraaf HJM, Boogerd LSF, Shahbazi Feshtali S, Fariña Sarasqueta A, Snel M, Swijnenburg RJ, Vahrmeijer AL, Bonsing BA, Mieog JSD. Intraoperative Near-Infrared Fluorescence Imaging of Multiple Pancreatic Neuroendocrine Tumors: A Case Report. *Pancreas*. 2018 Jan;47(1):130-133. doi: 10.1097/MPA.0000000000000951.

52. Eyüpoglu IY, Buchfelder M, Savaskan NE. Surgical resection of malignant gliomas-role in optimizing patient outcome. *Nat Rev Neurol*. 2013 Mar;9(3):141-51. doi: 10.1038/nrneurol.2012.279.

53. Namikawa T, Yatabe T, Inoue K, Shuin T, Hanazaki K. Clinical applications of 5-aminolevulinic acid-mediated fluorescence for gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2015 Aug 7;21(29):8769-75. doi: 10.3748/wjg.v21.i29.8769.

54. Eyüpoglu IY, Hore N, Savaskan NE, Grummich P, Roessler K, Buchfelder M, Ganslandt O. Improving the extent of malignant glioma resection by dual intraoperative visualization approach. *PLoS One*. 2012;7(9):e44885. doi: 10.1371/journal.pone.0044885.

55. Maas SLN, van Solinge TS, Schnoor R, Yekula A, Senders JT, de Vrij J, Robe P, Carter BS, Balaj L, Arkesteijn GJA, Nolte-'t Hoen ENM, Broekman MLD. Orally Administered 5-aminolevulinic Acid for Isolation and Characterization of Circulating Tumor-Derived Extracellular Vesicles in Glioblastoma Patients. *Cancers (Basel)*. 2020 Nov 7;12(11):3297. doi: 10.3390/cancers12113297.

56. Alieva M, van Rheenen J, Broekman MLD. Potential impact of invasive surgical procedures on primary tumor growth and metastasis. *Clin Exp Metastasis*. 2018 Apr;35(4):319-331. doi: 10.1007/s10585-018-9896-8.

57. Jakola AS, Myrmel KS, Kloster R, Torp SH, Lindal S, Unsgård G, Solheim O. Comparison of a strategy favoring early surgical resection vs a strategy

favoring watchful waiting in low-grade gliomas. *JAMA*. 2012 Nov 14;308(18):1881-8. doi: 10.1001/jama.2012.12807.

58. Shankar GM, Balaj L, Stott SL, Nahed B, Carter BS. Liquid biopsy for brain tumors. *Expert Rev Mol Diagn*. 2017 Oct;17(10):943-947. doi: 10.1080/14737159.2017.1374854.

59. Stummer W, Stocker S, Novotny A, Heimann A, Sauer O, Kempfski O, Plesnila N, Wietzorrek J, Reulen HJ. In vitro and in vivo porphyrin accumulation by C6 glioma cells after exposure to 5-aminolevulinic acid. *J Photochem Photobiol B*. 1998 Sep;45(2-3):160-9. doi: 10.1016/s1011-1344(98)00176-6.

60. Zhao SG, Chen XF, Wang LG, Yang G, Han DY, Teng L, Yang MC, Wang DY, Shi C, Liu YH, Zheng BJ, Shi CB, Gao X, Rainov NG. Increased expression of ABCB6 enhances protoporphyrin IX accumulation and photodynamic effect in human glioma. *Ann Surg Oncol*. 2013 Dec;20(13):4379-88. doi: 10.1245/s10434-011-2201-6.

61. Hadjipanayis CG, Widhalm G, Stummer W. What is the Surgical Benefit of Utilizing 5-Aminolevulinic Acid for Fluorescence-Guided Surgery of Malignant Gliomas? *Neurosurgery*. 2015 Nov;77(5):663-73. doi: 10.1227/NEU.0000000000000929.

62. Diaz RJ, Dios RR, Hattab EM, Burrell K, Rakopoulos P, Sabha N, Hawkins C, Zadeh G, Rutka JT, Cohen-Gadol AA. Study of the biodistribution of fluorescein in glioma-infiltrated mouse brain and histopathological correlation of intraoperative findings in high-grade gliomas resected under fluorescein fluorescence guidance. *J Neurosurg*. 2015 Jun;122(6):1360-9. doi: 10.3171/2015.2.JNS132507.

63. Hawkins BT, Egleton RD. Fluorescence imaging of blood-brain barrier disruption. *J Neurosci Methods*. 2006 Mar 15;151(2):262-7. doi: 10.1016/j.jneumeth.2005.08.006.

64. Wang L, Gaigalas AK, Blasic J, Holden MJ. Spectroscopic characterization of fluorescein- and tetramethylrhodamine-labeled oligonucleotides

and their complexes with a DNA template. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2004 Oct;60(12):2741-50. doi: 10.1016/j.saa.2004.01.013.

65. Kwan AS, Barry C, McAllister IL, Constable I. Fluorescein angiography and adverse drug reactions revisited: the Lions Eye experience. *Clin Exp Ophthalmol.* 2006 Jan-Feb;34(1):33-8. doi: 10.1111/j.1442-9071.2006.01136.x.

66. Lee T, Sanderson D, Doyle P, Buchsbaum G. Anaphylactic Shock After Intravenous Fluorescein Administration for Intraoperative Cystoscopy. *Obstet Gynecol.* 2018 Apr;131(4):727-729. doi: 10.1097/AOG.0000000000002519.

67. Acerbi F, Broggi M, Eoli M, Anghileri E, Cavallo C, Boffano C, Cordella R, Cuppini L, Pollo B, Schiariti M, Visintini S, Orsi C, La Corte E, Broggi G, Ferroli P. Is fluorescein-guided technique able to help in resection of high-grade gliomas? *Neurosurg Focus.* 2014 Feb;36(2):E5. doi: 10.3171/2013.11.FOCUS13487.

68. Álamo P, Pallarès V, Céspedes MV, Falgàs A, Sanchez JM, Serna N, Sánchez-García L, Voltà-Duràn E, Morris GA, Sánchez-Chardi A, Casanova I, Mangues R, Vazquez E, Villaverde A, Unzueta U. Fluorescent Dye Labeling Changes the Biodistribution of Tumor-Targeted Nanoparticles. *Pharmaceutics.* 2020 Oct 22;12(11):1004. doi: 10.3390/pharmaceutics12111004.

69. Kornblau IS, El-Annan JF. Adverse reactions to fluorescein angiography: A comprehensive review of the literature. *Surv Ophthalmol.* 2019 Sep-Oct;64(5):679-693. doi: 10.1016/j.survophthal.2019.02.004.

70. Ung TH, Serva S, Chatain GP, Witt JP, Finn M. Application of sodium fluorescein for spinal cord lesions: intraoperative localization for tissue biopsy and surgical resection. *Neurosurg Rev.* 2022 Apr;45(2):1563-1569. doi: 10.1007/s10143-021-01676-1.

71. Lu G, van den Berg NS, Martin BA, Nishio N, Hart ZP, van Keulen S, Fakurnejad S, Chirita SU, Raymundo RC, Yi G, Zhou Q, Fisher GA, Rosenthal EL, Poultides GA. Tumour-specific fluorescence-guided surgery for pancreatic cancer using panitumumab-IRDye800CW: a phase 1 single-centre, open-label, single-arm, dose-escalation study. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2020 Aug;5(8):753-764. doi: 10.1016/S2468-1253(20)30088-1.

72. Lacivita E, Leopoldo M, Berardi F, Colabufo NA, Perrone R. Activatable fluorescent probes: a new concept in optical molecular imaging. *Curr Med Chem.* 2012;19(28):4731-41. doi: 10.2174/092986712803341511.

73. Gargin V, Radutny R, Titova G, Bibik D, Kirichenko A, Bazhenov O. Application of the computer vision system for evaluation of pathomorphological images. 2020 IEEE 40th International Conference on Electronics and Nanotechnology, ELNANO 2020 - Proceedings; 2020:469-473. doi: 10.1109/ELNANO50318.2020.9088898.

74. Nechyporenko A, Alekseeva V, Nazaryan R, Gargin V. Biometric recognition of personality based on spiral computed tomography data. 2021 IEEE 16th International Conference on the Experience of Designing and Application of CAD Systems. 2021; 9385267:11-15. doi: 10.1109/CADSM52681.2021.9385267

75. Radutny R, Nechyporenko A, Alekseeva V, Titova G, Bibik D, Gargin V. Automated measurement of bone thickness on SCT sections and other images. 2020 IEEE Third International Conference on Data Stream Mining & Processing. 2020;9204289:222-226. doi: 10.1109/DSMP47368.2020.9204289

76. Hollandsworth HM, Schmitt V, Amirfakhri S, Filemoni F, Schmidt A, Landström M, Lyndin M, Backert S, Gerhard M, Wennemuth G, Hoffman RM, Singer BB, Bouvet M. Fluorophore-conjugated *Helicobacter pylori* recombinant membrane protein (HopQ) labels primary colon cancer and metastases in orthotopic mouse models by binding CEA-related cell adhesion molecules. *Transl Oncol.* 2020 Dec;13(12):100857. doi: 10.1016/j.tranon.2020.100857.

77. Hammarström S. The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Semin Cancer Biol.* 1999 Apr;9(2):67-81. doi: 10.1006/scbi.1998.0119.

78. Javaheri A, Kruse T, Moonens K, Mejías-Luque R, Debraekeleer A, Asche CI, Tegtmeyer N, Kalali B, Bach NC, Sieber SA, Hill DJ, Königer V, Hauck CR, Moskalenko R, Haas R, Busch DH, Klaile E, Slevogt H, Schmidt A, Backert S, Remaut H, Singer BB, Gerhard M. *Helicobacter pylori* adhesin HopQ engages in a

virulence-enhancing interaction with human CEACAMs. *Nat Microbiol.* 2016 Oct 17;2:16189. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.189.

79. Königer V, Holsten L, Harrison U, Busch B, Loell E, Zhao Q, Bonsor DA, Roth A, Kengmo-Tchoupa A, Smith SI, Mueller S, Sundberg EJ, Zimmermann W, Fischer W, Hauck CR, Haas R. Erratum: *Helicobacter pylori* exploits human CEACAMs via HopQ for adherence and translocation of CagA. *Nat Microbiol.* 2016 Oct 31;2:16233. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.233.

80. Moonens K, Hamway Y, Neddermann M, Reschke M, Tegtmeier N, Kruse T, Kammerer R, Mejías-Luque R, Singer BB, Backert S, Gerhard M, Remaut H. *Helicobacter pylori* adhesin HopQ disrupts trans dimerization in human CEACAMs. *EMBO J.* 2018 Jul 2;37(13):e98665. doi: 10.15252/embj.201798665.

81. Kovar JL, Simpson MA, Schutz-Geschwender A, Olive DM. A systematic approach to the development of fluorescent contrast agents for optical imaging of mouse cancer models. *Anal Biochem.* 2007 Aug 1;367(1):1-12. doi: 10.1016/j.ab.2007.04.011.

82. Hollandsworth HM, Amirfakhri S, Filemoni F, Schmitt V, Wennemuth G, Schmidt A, Hoffman RM, Singer BB, Bouvet M. Anti-carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule antibody for fluorescence visualization of primary colon cancer and metastases in patient-derived orthotopic xenograft mouse models. *Oncotarget.* 2020 Jan 28;11(4):429-439. doi: 10.18632/oncotarget.27446.