

УДК: 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
_____ Чорноус А.М.

**ЗВІТ
ПРО НАУКОВО-ДОСЛІДНУ РОБОТУ**

Розробка методу інтраопераційної діагностики злоякісних пухлин за допомогою флюорофор-кон'югованих антитіл до молекул раково-ембріонального антигену

**ІМУНОГІСТОХІМІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ТКАНИН. СТВОРЕННЯ
ФЛЮОРОФОР-КОН'ЮГОВАНИХ АНТИ-СЕАСАМ АНТИТІЛ
(проміжний)**

Науковий керівник
канд.мед наук, доцент

М.С. Линдін

2021

Рукопис закінчено 22 грудня 2021 р.

Результати роботи розглянуто науковою радою СумДУ, протокол від 25.11.2021 р. №5

СПИСОК АВТОРІВ

Керівник НДР, гол. наук. співроб., канд. мед. наук	_____	М.С. Линдін (розділ 1,2,3,4,5)
	(22.12.2021)	
Відповідальний виконавець, ст.наук. співроб., канд. мед. наук	_____	В.В. Сікора (розділ 1,2,3,4,5)
	(22.12.2021)	
Молодший наук. співроб., канд. мед. наук	_____	Я.О. Кравченко (розділ 1,5)
	(22.12.2021)	
Наук. співроб., канд. мед. наук	_____	Ю.М. Линдіна (розділ 2,3,4,5)
	(22.12.2021)	
Молодший наук. співроб., канд. мед. наук	_____	О.Б. Берест (розділ 5)
	(22.12.2021)	
Виконавець, канд. мед. наук	_____	Н.І. Гирявенко (розділ 1,2,4,5)
	(22.12.2021)	
Наук. співроб., канд. мед. наук	_____	О.М. Олешко (розділ 2,5)
	(22.12.2021)	
Молодший наук. співроб., доктор. мед. наук	_____	Є.В. Кузенко (розділ 1,4,5)
	(22.12.2021)	
Молодший наук. співроб., канд. мед. наук	_____	О.О. Тимакова (розділ 1,3,4)
	(22.12.2021)	
Молодший наук. співроб.	_____	К.О. Сікора (розділ 2,4,5)
	(22.12.2021)	
Наук. співроб., канд. мед. наук	_____	Т.Б. Олешко (розділ 1,3)
	(22.12.2021)	
Лаборант	_____	Ю.О. Варава (розділ 1)
	(22.12.2021)	
Виконавець	_____	Ю.А. Сорока (розділ 4)
	(22.12.2021)	

Виконавець	<hr/> (22.12.2021)	Р.А. Чижма (розділ 2)
Виконавець	<hr/> (22.12.2021)	Я.В. Сікора (розділ 3)
Лаборант	<hr/> (22.12.2021)	І.К. Янко (розділ 5)
Лаборант	<hr/> (22.12.2021)	Я.А. Бова (розділ 4)
Виконавець	<hr/> (22.12.2021)	Б.М. Карпенко (розділ 4)
Лаборант	<hr/> (22.12.2021)	В.Г. Золотарьова (розділ 3)

РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 61 с., 20 рис., 76 джерел.

ЕНДОМЕТРІОЇДНІ АДЕНОКАРЦИНОМИ, ІМУНОГІСТОХІМІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ, МКА-РЕА, МОЛОЧНА ЗАЛОЗА, ПЛОСКОКЛІТИННИЙ РАК, РАК МАТКОВИХ ТРУБ.

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:

- Провести імуногістохімічне дослідження нормальної та пухлинної тканин щодо експресії різних типів СЕАСАМ;
- Виконати «картування» імунологічного профілю карцином;
- Кон'югувати анти-СЕАСАМ антитіла з флюорофорами.

Методи дослідження – гістологічне (забарвлення гематоксиліном та еозином) та імунофлюоресцентне (визначення експресії СЕАСАМ) дослідження післяопераційного матеріалу; створення флюорофор-кон'югованих анти-СЕАСАМ антитіл згідно протоколів виробника флюорофорів; математичні методи. Дослідження спрямовані на встановлення імунофенотипу нормальної та пухлинної тканини, визначення впливу молекул клітинної адгезії на морфологічні та молекулярно-генетичні особливості карцином.

ЗМІСТ

Вступ.....	6
1 Морфологічні та імуногістохімічні особливості плоскоклітинного раку шийки матки.....	8
2 Морфологічні та імуногістохімічні особливості інвазивного раку неспецифічного типу з медулярним компонентом.....	16
3 Експресія молекул клітинної адгезії у тканині ендометрію та ендометріюїдних аденокарцином.....	23
4 Молекулярно-генетичні особливості ендометріюїдних ендометріальних аденокарцином.....	27
5 Особливості діагностики первинного раку маткових труб під час і після операції.....	38
Висновки.....	51
Перелік джерел посилання.....	53

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 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 [11]. Основним етіологічним фактором його виникнення є папіломавірус 16 людини [12], хоча підґрунтям для цього можуть бути різні інші місцеві та загальні патологічні стани (запалення, спадковість, імунодифіцит, тощо) [13-15]. 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 [16]. 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 [17, 18].

Незважаючи на значні досягнення у виявленні та лікуванні плоскоклітинних карцином, і досі залишається високим рівень летальності від цієї патології [11]. Це спонукає до більш детального морфологічного дослідження цих пухлин та пошуку нових діагностично-прогностичних маркерів. Одними з таких індикаторів пухлинної прогресії можуть бути молекули клітинної адгезії раково-ембріонального антигену (МКА-РЕА), які знайдено у переважній більшості епітеліальних клітин, ендотелії судин та лейкоцитах [19, 20]. Серед них найбільш вивченими представниками є МКА-РЕА1, 5 та 6. З одного боку, вони беруть участь у функціонуванні організму, впливаючи на процеси ангиогенезу, обмін речовин, імунну відповідь та інші. З іншого боку, коливання їх у неопластичній тканині відображається на перебігу пухлинного процесу [19-22].

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. 1.1), 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.

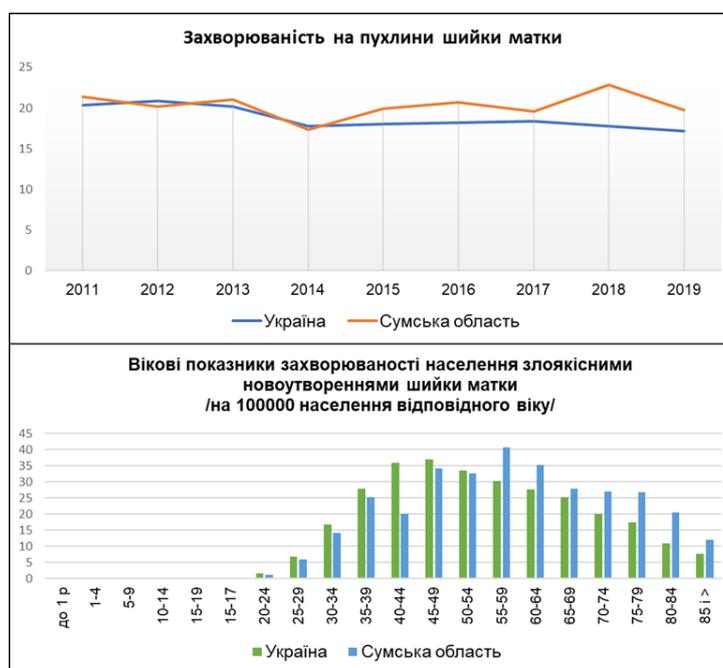


Рисунок 1.1 – Статистичні показники захворюваності на пухлини шийки матки в Україні та Сумській області.

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. 1.2).

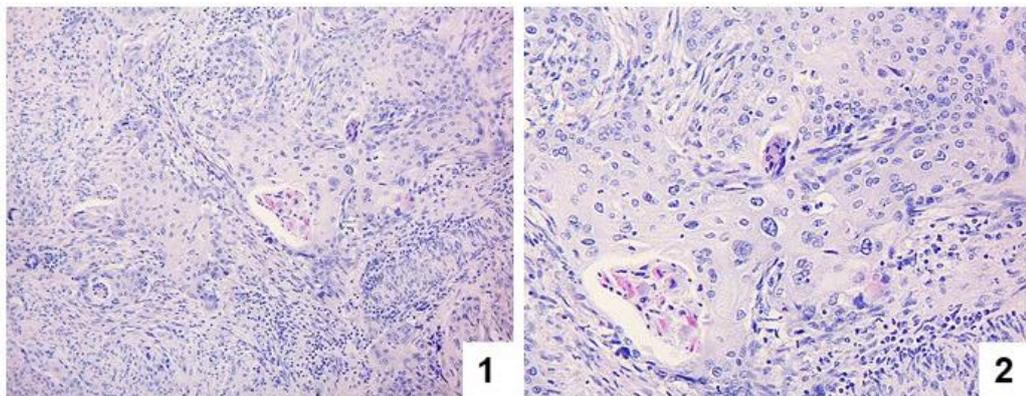


Рисунок 1.2 – Інвазивний плоскоклітинний рак шийки матки. Забарвлення гематоксилином та еозином. Збільшення: x100 (1) та x200 (2).

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 варіжаний 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. 1.3).

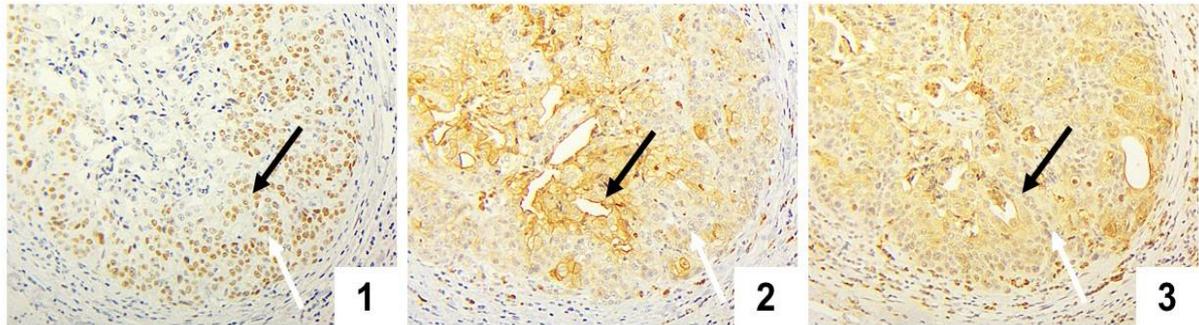


Рисунок 1.3 – Тканина плоскоклітинного раку шийки матки. Наявність (чорна стрілка) та відсутність (біла стрілка) експресії МКА-РЕА у ER-позитивній тканині. ІГХ дослідження експресії ER (1), МКА-РЕА1 (2) та МКА-РЕА6 (3). Збільшення: $\times 200$.

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 $r=0,06$, $p=0,24$).

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 Кі-67 у карциномах (рис. 1.4).

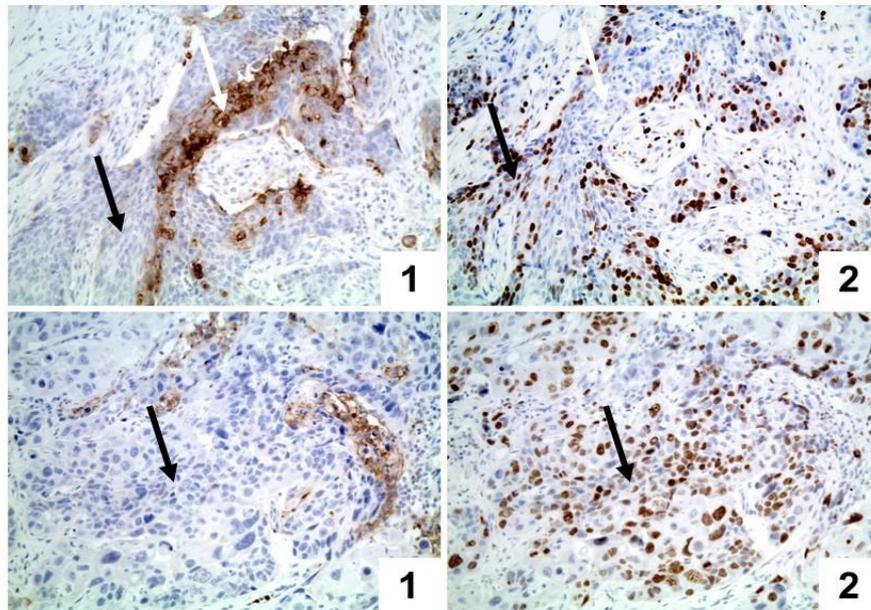


Рисунок 1.4 – Тканина плоскоклітинного раку шийки матки. Пухлинна тканина з гетерогенною експресією МКА-РЕА1: чорна стрілка – відсутність експресії, біла стрілка – наявність експресії. ІГХ дослідження експресії МКА-РЕА1 (1) та Кі-67 (2). Збільшення: x200.

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 Кі-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 проліферативним 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).

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. 1.5). Вони беруть участь у активації інгібіторів клітинного циклу; опосередковують MAPK 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 циклізалежних 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 1.5 - Механізми інгібуючого впливу МКА-РЕА1 на проліферативну активність клітин.

2 МОРФОЛОГІЧНІ ТА ІМУНОГІСТОХІМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ІНВАЗИВНОГО РАКУ НЕСПЕЦИФІЧНОГО ТИПУ З МЕДУЛЯРНИМ КОМПОНЕНТОМ

Рак молочної залози (РМЗ) є найбільш розповсюдженою злоякісною пухлиною серед населення (11.7% випадків). У жінок цей показник досягає 24.5%. Не зважаючи на виявлення захворювань на більш ранніх стадіях, смертність від РМЗ залишається на дуже високому рівні (6.9% онкологічної летальності) [24]. Перебіг захворювання, чутливість до терапії та прогноз залежать від гістологічного типу пухлин, ступеню диференціювання, стадії, судинної інвазії, а також імунофенотипу пухлинних клітин та імуного мікрооточення [25]. До нещодавнього часу одним з найсприятливіших варіантів of РМЗ вважався медулярний рак [26]. В останній WHO класифікації пухлин молочної залози (2018 р.) цей варіант карциноми включено в інвазивні раки неспецифічного тип (ІРНТ), який має назву ІРНТ з медулярним компонентом [25,27].

Як і раніше цей різновид ІВС-NST характеризується чіткими межами, синтиційним ростом без залозистих утворень та вираженою запальною інфільтрацією [25,28]. Вони переважно є потрійно-негативними (без експресії estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and HER2). Окрім цього мають виражену проліферативну активність пухлинних клітин та експресію p53 [28]. Не зважаючи на прогностично несприятливі гістологічні характеристики, ІРНТ з медулярним компонентом має відносно сприятливий прогноз [25,29,30]. Це насамперед пов'язано з якісними особливостями пухлинного мікрооточення (вираженою інфільтрацією TIL) та вираженою адгезією пухлинних клітин (експресія E-cadherin та відсутність MMP1) [25,29,30].

Унікальність сприятливого перебігу цієї high-grade карциноми недостатньо обґрунтована наявністю чи відсутністю вищезазначених білків. Це аргументує подальші дослідження, які б пояснили невідповідність між

морфологічними та клінічними особливостями ІРНТ з медулярним компонентом.

Результати дослідження та обговорення. Результати імуногістохімічного дослідження показали, що тканина ІРНТ з медулярним компонентом у всіх випадках є ER-, PR- та HER2-негативною. Натомість пухлинні клітини мають виражену проліферативну активність (експресія Ki-67 у $78.4 \pm 4.6\%$ пухлинних клітин), експресію мутантного p53 (92% випадків) та гіперпродукцію антиапоптичного білка bcl-2 у всіх випадках (рис. 2.1). Окрім неопластичних клітин, Ki-67- та bcl-2-позитивними були деякі клітини імунного інфільтрату пухлинного мікрооточення.

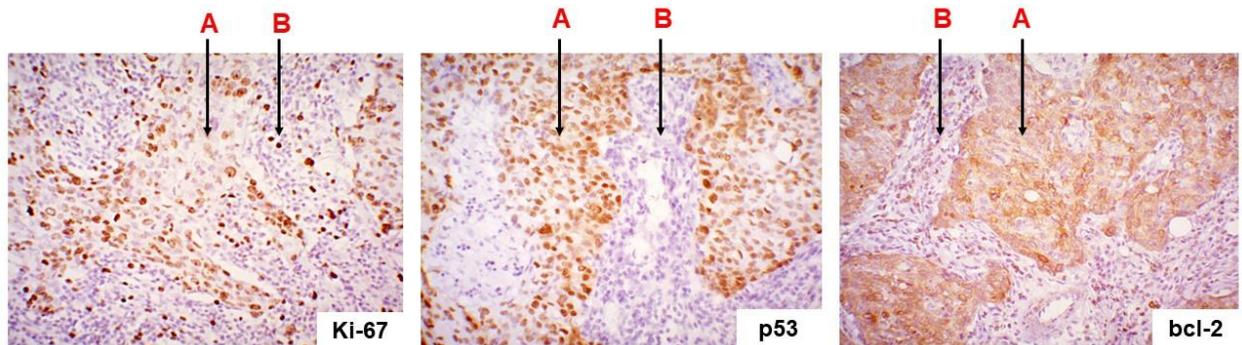


Рисунок 2.1 – ІРНТ з медулярним компонентом. Виражена експресія Ki-67, p53 і bcl-2 в пухлинних клітинах (A); клітини імунного мікрооточення (Ki-67- та bcl-2-позитивна експресія) (B). Імуногістохімічне дослідження Ki-67, p53 і bcl-2. Збільшення x200.

Всі випадки ІРНТ з медулярним компонентом мали виражену експресію E-cadherin, EGFR та PD-L1 у ракових клітинах (рис. 2.2). Також виявлено помірну експресію обох шаперонів – помірно-позитивна ядерно-цитоплазматична експресія hsp70 у $74 \pm 6.3\%$ та hsp90 у $68 \pm 5.7\%$ пухлинних клітин. Натомість, більшість пухлинних клітин були або негативними, або мали слабку експресію VEGF та MMP1.

Особлива увага була приділена вивченню якісного складу пухлинного мікрооточення of IBC-NST with medullary pattern. Імуногістохімічне дослідження експресії CD20 (B-лімфоцити), CD3 (T-лімфоцити), CD4 (T-

хелпери), CD8 (Т-кілери), CD56 (натуральні кілери), CD138 (плазмоцити), CD68, S100, CD163 (експресуються макрофагами), MPO (гранулоцити), IgG, and IgM дозволило виявити специфічні особливості імунного інфільтрату (рис. 2.3).

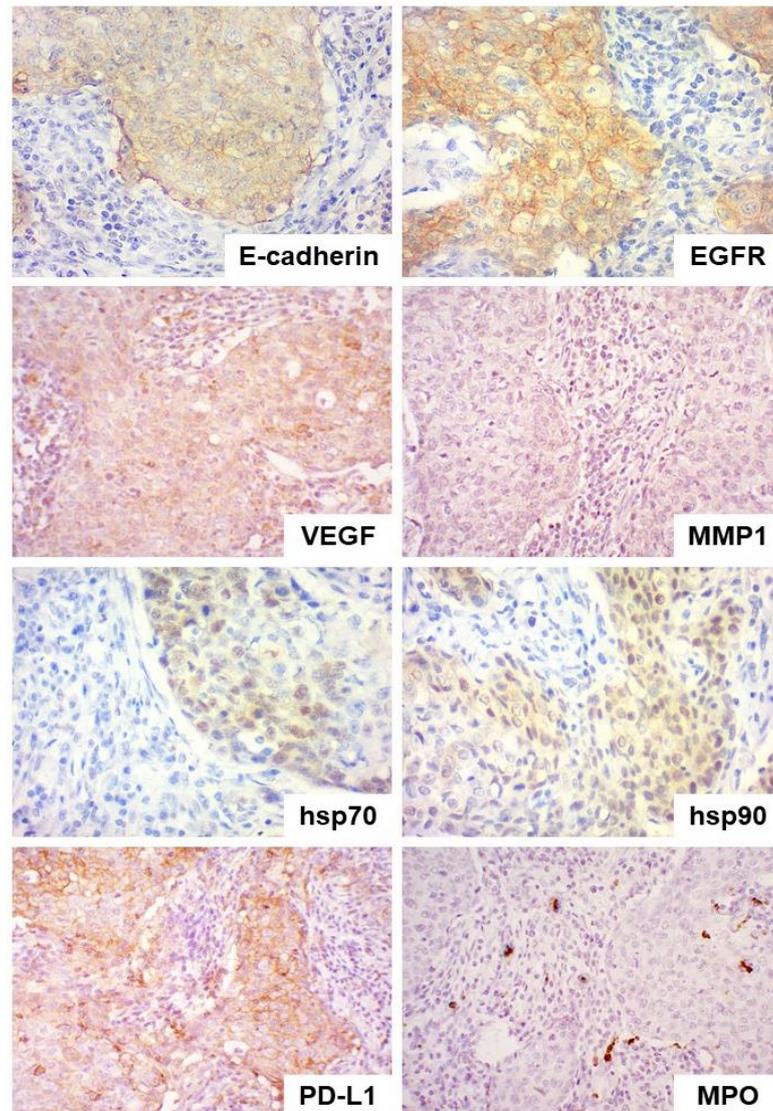


Рисунок 2.2 – IPHT з медулярним компонентом. Виражена експресія Е-кадгерину, EGFR і PD-L1; помірна експресія hsp70 і hsp90; слабка експресія MMP1 і VEGF; негативна експресія MPO в пухлинних клітинах, позитивна в розсіяних клітинах мікрооточення. Імуногістохімічне дослідження Е-кадгерину, EGFR, hsp70, hsp90, VEGF, MMP1, PD-L1 і MPO.

Збільшення x400.

Переважає більшість клітин пухлинного мікрооточення були представлені Т-лімфоцитами при відносно меншій кількості В-лімфоцитів, макрофагів, плазмацитів та гранулоцитів. Серед Т-лімфоцитів виявлено переважання Т helper cells (CD4+ cells) при відносно меншій кількості killer T cell (CD8+ cells) та Natural killer cells (NK cells, CD56+ cells) (Figure 3).

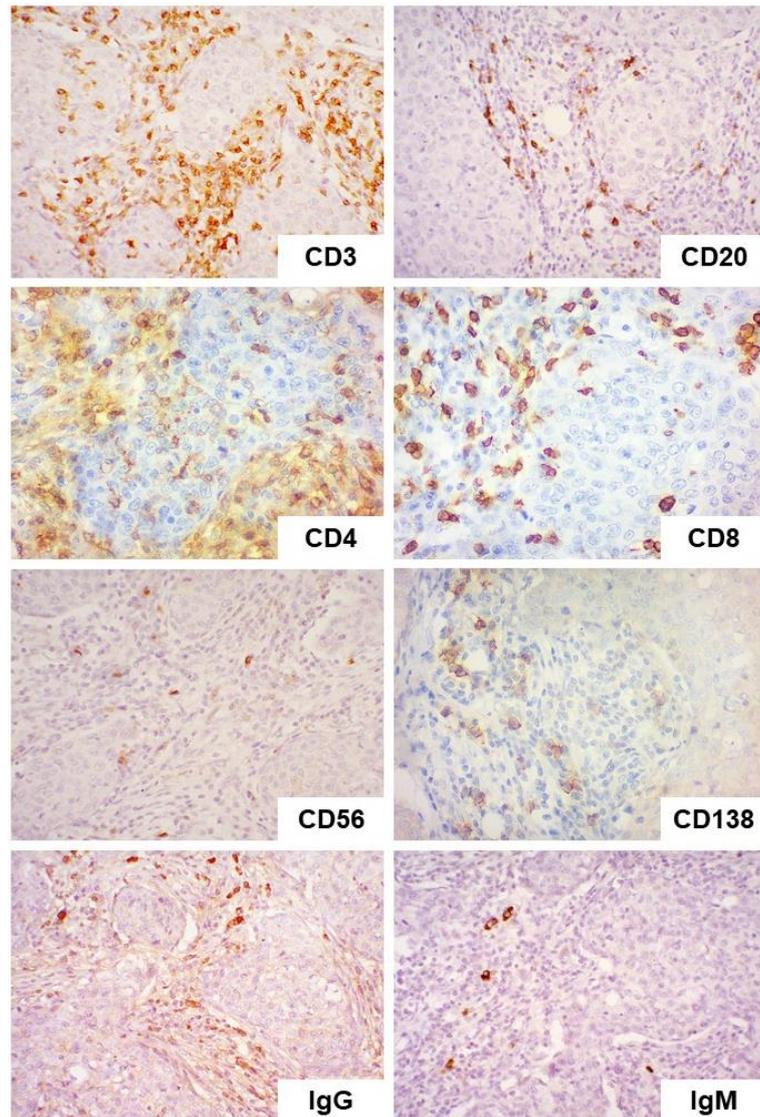


Рисунок 2.3 – ІРНТ з медулярним компонентом. Імуногістохімічне дослідження CD20, CD3, CD4, CD8, CD56, CD138, IgG та IgM.

Збільшення x400.

У мікрооточенні пухлин виявлено поодинокі та згруповані розташовані плазматичні клітин, кількість яких інколи досягала близько 8% клітин імунного інфільтрату. Разом з тим, більшість В-лімфоцитів та плазматичних клітин експресують рецептори IgG, деякі з них мають експресію IgM.

Дослідження макрофагального компоненту (CD68+ cells) пухлинного мікрооточення показало наявність значної їх кількості як серед пухлинних клітин, так і у складі імунного інфільтрату (рис. 1.4). Слід зазначити, що активовані їх форми (S100+ cells) локалізувалися переважно у оточенні ракових клітин. Серед макрофагів значна частка припадали на M2-макрофаги (CD163+ cells), які дифузно розташовувалися у всіх компонентах неопластичної тканини.

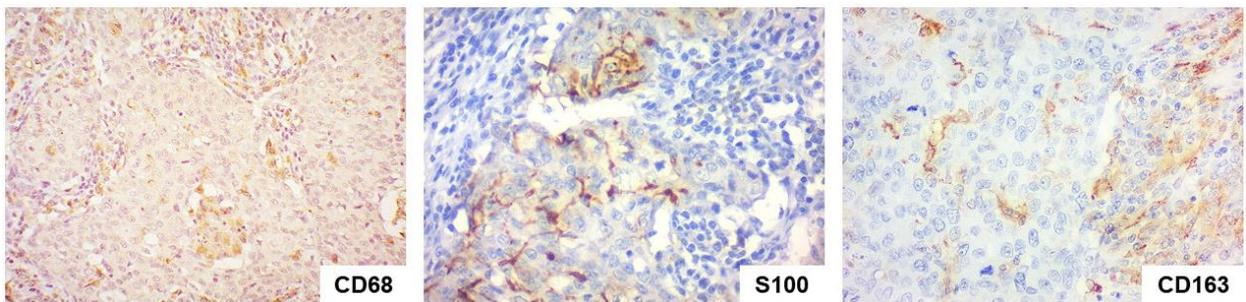


Рисунок 2.4 – IPHT з медулярним компонентом. Імуногістохімічне дослідження CD68, S100 і CD163. Збільшення x400.

Підрахунок кожного типу імунокомпетентних клітин у пухлинному мікрооточенні показав наступне їх співвідношення: CD3+:CD20+:CD138+:CD56+:CD68+:MPO = 0.44:0.13:0.09:0.09:0.22:0.03.

Перебіг злякисних пухлин визначається багатьма факторами, серед яких ключовими є морфологічні та молекулярно-генетичні особливості туморозної тканини [25]. Серед них особлива увага приділяється якісному складу пухлинному мікрооточенню [31]. Особливим варіантом злякисних пухлин молочної залози є IPHT з медулярним компонентом, який має

унікальні сприятливі прогностичні особливості на фоні high-grade пухлинного росту [25,29,30].

Наше дослідження присвячене встановленню імуногістохімічних особливостей IPHT з медулярним компонентом, які б могли пояснити невідповідність між морфологічними та клінічними особливостями цих пухлин. Було виявлено, що ракові клітини мають виражену проліферативну активність (експресія Ki-67), спроможність блокувати природній та медикаментозний апоптоз клітин (експресія p53 and bcl-2), експресію прогностично-несприятливих білків EGFR, hsp70, hsp90, and PD-L1, які індуюють прогресування неопластичного процесу [31]. При цьому вони є також ER- та PR-негативними. На противагу цьому, більшість пухлинних клітин не експресують HER2, мають слабку експресію VEGF, MMP1 та сильну експресію E-cadherin, які визначають переважно прогностично-сприятливий перебіг карцином [32].

Проведене дослідження демонструє виражену варіабельність якісного складу пухлинного мікрооточення IPHT з медулярним компонентом. Воно представлене переважно TIL, серед яких домінуючою популяцією є T-лімфоцити. Більша частина T-лімфоцитів представлена CD4+ клітини. При цьому у складі імунного інфільтрату наявна і значна кількість CD8+ клітини, NK клітини, B-лімфоцитів та плазмоцитів. Окрім цього, неопластична тканина інфільтрована значною кількістю макрофагів. Слід зазначити, що більшість активованих макрофагів (S100+ клітини) мають тісний контакт з раковими клітинами. Одночасно з цим, у пухлинному мікрооточенні виявлено значну кількість M2-макрофагів (CD163+ клітини), які, як відомо, мають прогностично-несприятливий вплив на перебіг неопластичного процесу [33].

Аналізуючи вищезазначене, ми вбачаємо, що унікальність перебігу IPHT з медулярним компонентом зумовлена наступними факторами: цей різновид пухлини характеризується злагодженим поєднанням агресивних та сприятливих імунофенотипічних особливостей пухлинних клітин та

імунного мікрооточення. З одного боку, пухлинна тканина має відсутність ER та PR, високий проліферативний індекс, надекспресію p53, bcl-2, EGFR, hsp70, hsp90, PD-L1, та значну кількість M2-макрофагів. З іншого боку, незначна кількість прометастатичних білків (VEGF, MMP1), відсутність експресії HER2 та виражена адгезивна здатність пухлинних клітин перешкоджають місцевому та віддаленому розповсюдженні пухлини. Крім того, активна протидія з боку макроорганізму у вигляді вираженої активації клітинної (макрофаги, CD4+ та CD8+ клітини, клітини) та гуморальної (активовані макрофаги, В-лімфоцити, CD4+ Т-клітини, плазмоцити, синтез IgG) ланок місцевого імунного захисту сприяють обмеженню розповсюдження РМЗ.

Більш за все, у тканині IPHT з медулярним компонентом сприятливі фактори (індикатори захисту) переважають над агресивними факторами. Це призводить до прогностично-сприятливого перебігу злоякісного процесу, не зважаючи на наявність низки негативних морфологічних та імуногістохімічних особливостей паренхіматозного та стромального компонентів пухлини.

3 ЕКСПРЕСІЯ МОЛЕКУЛ КЛІТИННОЇ АДГЕЗІЇ У ТКАНИНІ ЕНДОМЕТРІУ ТА ЕНДОМЕТРІОЇДНИХ АДЕНОКАРЦИНОМ

Ендометриодні ендометріальні аденокарциноми (ЕЕА) є найбільш розповсюдженим гістологічним варіантом злоякісних пухлин у порожнині матки [34]. Вони складають близько 70-80% всіх ендометріальних пухлин [34,35], які у залежності від площі, зайнятої солідним пухлинним ростом, поділяються на високо- (grade 1), помірно- (grade 2) та низкодиференційовані (grade 3). Слід зазначити, що при вираженому клітинному плеоморфізмі grade може збільшуватись на одну позицію, незважаючи на площу солідного росту [36]. Основними труднощами у рутинній гістологічній практиці є віддиференціювання високо-диференційованих ендометриодних карцином від атипової гіперплазії ендометрію. Наявність інвазії строми, зникнення строми між залозами та утворення криброзних структур, десмопластична реакція строми та наявність папілярних структур виокремлює ці пухлини від гіперпластичних процесів [37].

Особливості експресії неопластичними клітинами молекул міжклітинної адгезії є надійним прогностичним фактором при прогресуванні злоякісних пухлин. Одним з важливим індикатором прогресування карцином є E-кадгерин, який визначає силу міжклітинної адгезії та здатності клітин до розповсюдження. Зниження експресії цих білків супроводжується зростанням метастатичного потенціалу пухлин та зниження виживаності хворих [38]. 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 [39]. Незважаючи на це, відомості про адгезивні властивості МКА-РЕА1 мають певні розбіжності. Згідно S. Hammarstrom у фізіологічних умовах МКА-РЕА1 не беруть участі в міжклітинній адгезії, враховуючи їх апікальну локалізацію на поляризованих клітинах [7].

Метою нашого дослідження стало вивчення особливостей експресії Е-кадгерину та МКА-РЕА1 у нормальному ендометрії та при ендометріїдних аденокарциномах.

Результати дослідження та їх обговорення. Експресія МКА-РЕА1 була виявлена на апікальній поверхні люмінального та залозистого циліндричного епітелію функціонального та базального шарів нормального ендометрію. Безперервне розташування МКА-РЕА1 на клітинних поверхнях створювало враження бар'єру між зовнішнім середовищем та підлеглими тканинами матки. ІГХ дослідження експресії МКА-РЕА1 у тканині ендометріїдних ендометріальних карцином виявило їх виражене гетерогенне розташування у пухлинних клітинах. У переважній більшості випадків МКА-РЕА1 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. 3.1).

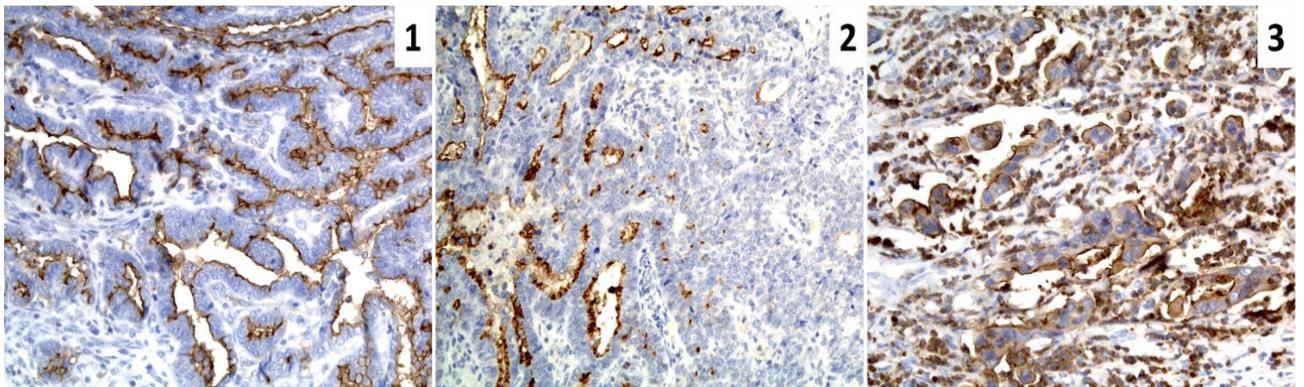


Рисунок 3.1 – ЕЕА. 1 – апікальна мембранна експресія; 2 – гетерогенна експресія (наявність рецептор-позитивних та рецептор-негативних вогнищ); 3 – мембрано-цитоплазматична експресія. ІГХ дослідження МКА-РЕА1.

Збільшення x200.

На противагу 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. 3.2).

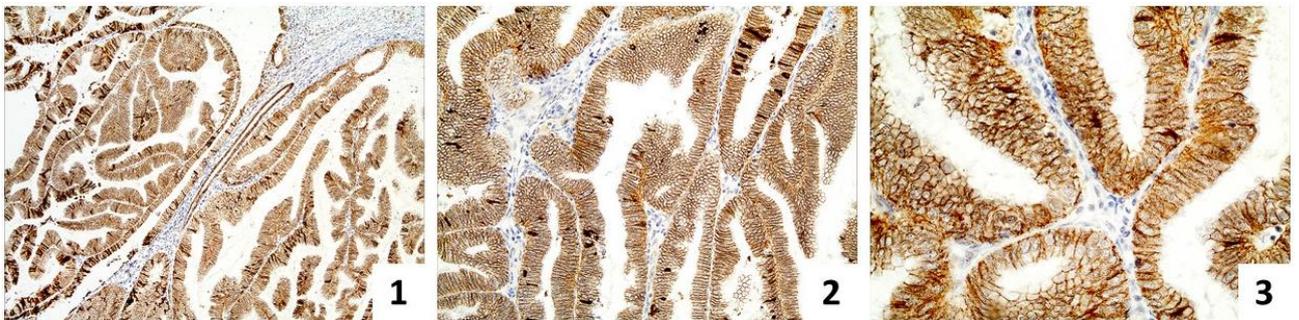


Рисунок 3.2 – ЕЕА. ІГХ дослідження МКА-РЕА1.

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 [39,41]. Інші показують їх інертність по відношенню до міцності міжклітинних з'єднань [40]. Значна кількість робіт вказує навіть на пригнічення адгезії при

експресії МКА-РЕА нормальними та пухлинними клітинами (наприклад регулюючи N-кадгерин) [42]. Для встановлення факту впливу МКА-РЕА на силу міжклітинного з'єднання нами виконано порівняння їх експресії з найбільш вивченим маркером адгезії E-кадгерином [38]. 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 [43], 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.

4 МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ЕНДОМЕТРІОЇДНИХ ЕНДОМЕТРІАЛЬНИХ АДЕНОКАРЦИНОМ

Злоякісні пухлини є однією з сучасних проблем в усьому світі, серед яких ендометріальні аденокарциноми виявляються у 2,2% випадків [44]. Прогноз їх залежить від низки факторів, у тому числі молекулярно-генетичного профілю пухлинних клітин [45]. На сьогодні доведена терапевтично-прогностична значимість експресії ER, PR, Ki-67 and p53 у перебігу злоякісних пухлин органів жіночої репродуктивної системи [46,47]. Не зважаючи на це постійно ведеться пошук нових прогностично-важливих індикаторів пухлинної прогресії ендометріальних аденокарцином.

Білки теплового шоку або шаперони (Hsp) є потенційними індикаторами ініціювання та прогресування карцином. На сьогодні найбільш вивченими Hsp є Hsp27, Hsp40, Hsp60, Hsp70 та Hsp90, які відрізняються не тільки молекулярною масою, а й виконуваними ними функціями. В організмі людини вони відіграють важливу роль як фолдінзі та транспортуванні внутрішньоклітинних білків, так і протидії негативному впливу стресових факторів (рефолдінг білків) [47-50]. Окрім цього встановлено участь Hsp у диференціюванні, прогресуванні карцином та резистентності до терапії [48,50-52].

У нормі Hsp70 та Hsp90 задіяні у фолдінгу білків та процесах виживаності клітин. У неопластичних клітинах вони задіяні в індукцію проліферації та інгібування апоптозу (при синтезі мутантного p53), промоцію інвазії та метастазування клітин, блокування імунної відповіді (при релізінгу їх з клітин – екстрацелюлярна форма), ангіогенезі (промоція експресії VEGF) [50,51]. Більш того, Hsp70 та Hsp90 можуть взаємодіяти як один з одним, так і з іншими шаперонами (Hsp40) [53].

У нормальному ендометрії шаперони експресуються впродовж усього менструального циклу [50]. При цьому спостерігається пригнічення експресії Hsp90 та посилення Hsp70 у фазу секреції. Hsp70 експресується виключно

епітеліальними клітинами ендометрію. Натомість Hsp90 виявляється також в ендотеліальних клітинах [50]. В органах репродуктивної системи вони беруть участь у підтриманні сталості епітеліальних клітин, розвитку ембріонів, процесах овогенезу та інші [47].

Виражене коливання експресії Hsp70 та Hsp90 виявлено при карциномах органів репродуктивної системи жінок та молочної залози [51]. Інтенсифікація їх експресії спостерігається також при гіперплазіях ендометрію (всіх типах) [54]. Hsp70 та Hsp90 спільно функціонують з ER, беручи участь у їх транскрипції та функціонуванні [55]. З одного боку, у тканині не-ендометріюїдних та низько-диференційованих ендометріюїдних карциномах виявлено відсутність ER при одночасному збереженні експресії Hsp70. Натомість виражена експресія Hsp90 супроводжується надекспресією ER [56]. З іншого боку, деякі дослідження демонструють відсутність будь-якої залежності між ними у тканині карцином [17]. Наявність експресії Hsp90, яка спостерігалась у 30% випадків, була індикатором кращого прогнозу при ендометріальних карциномах [51]. Натомість у молочній залозі виявлено протилежні результати [57]. Експресія Hsp70 (спостерігалась у 50% випадків ендометріальних карцином) пов'язана з гіршим прогнозом [51]. Наявність ендометріальних карцином супроводжується вираженим зменшенням Hsp70 у крові [58].

Дослідження, проведене Wataba K. Та інш., не виявило коливання Hsp70 у ендометріюїдних карциномах (порівняно з нормою та гіперплазіями). При цьому Hsp90 виявлявся інтенсивніше у карциномах та зменшувався при дедиференціюванні пухлин [54].

Результати дослідження та їх обговорення. Для встановлення особливостей варіабельності експресії вищезазначених рецепторів при неопластичній трансформації ми першочергово дослідили їх експресію у нормальному ендометрії. Незалежно від фази менструального циклу люмінальні та залозисті клітини ендометрію експресували ER та PR. Ендометрій фази проліферації мав виражену експресію ER ($94,1 \pm 6,5\%$) та PR

($82,5 \pm 8,4\%$) (рис. 4.1 – верхня панель). При цьому експресія обох рецепторів досягала свого піку у пізню фазу проліферації. Ендометрій фази секреції характеризувався поступовим зниженням експресії ER та PR з максимальним їх зниженням у середній фазі секреції (рис. 4.2 – верхня панель).

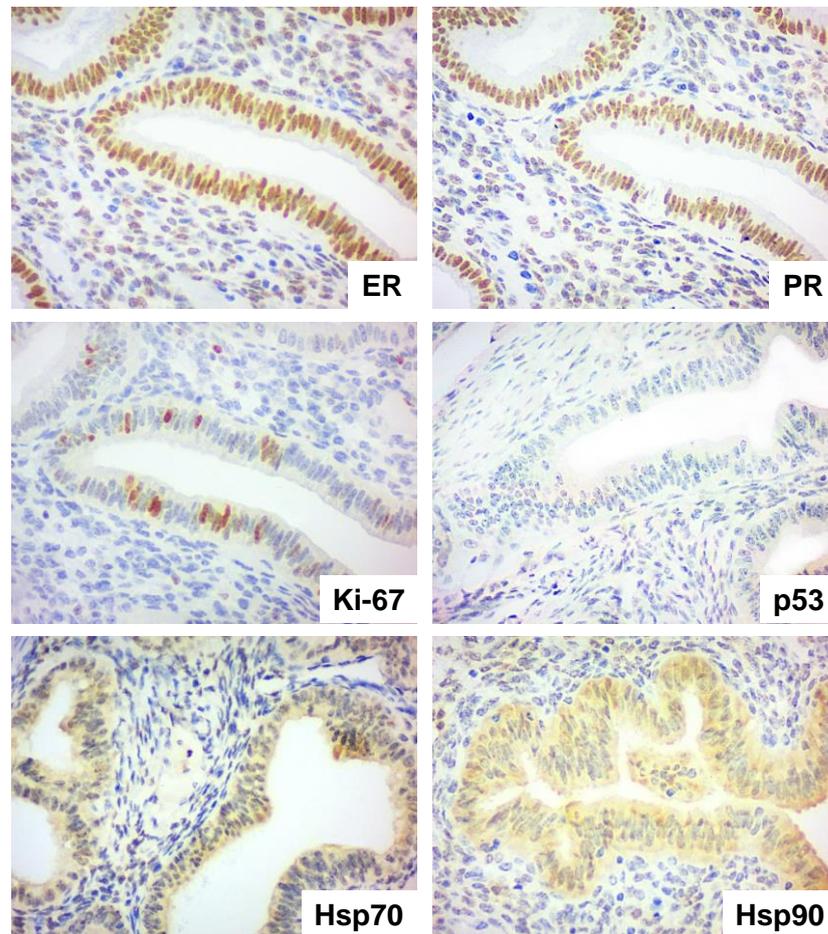


Рисунок 4.1 – Нормальний ендометрій фази проліферації. Наявна виражена ядерна експресія ER та PR, помірно виражена ядерна експресія Ki-67, відсутність експресії p53, помірно виражена ядерно-цитоплазматична експресія Hsp70 and Hsp90. Оцінка експресії проводилась виключно у епітеліальному компоненті тканини. Імуногістохімічне дослідження of ER, PR, Ki-67, p53, Hsp70 and Hsp90. Збільшення x400.

Більш виражена проліферативна активність залозистого епітелію спостерігалась у фазі проліферації менструального циклу (експресія Ki-67 виявлена у близько 20,5 % клітин). У фазі секреції епітеліальні клітини мали

значно нижчу мітотичну активність – експресія Ki-67 виявлена у близько 4,5% клітин. Натомість, ми не виявили жодної клітини у нормальному ендометрії протягом усього менструального циклу, які б експресували p53 (рис. 4.1-4.2 – середня панель).

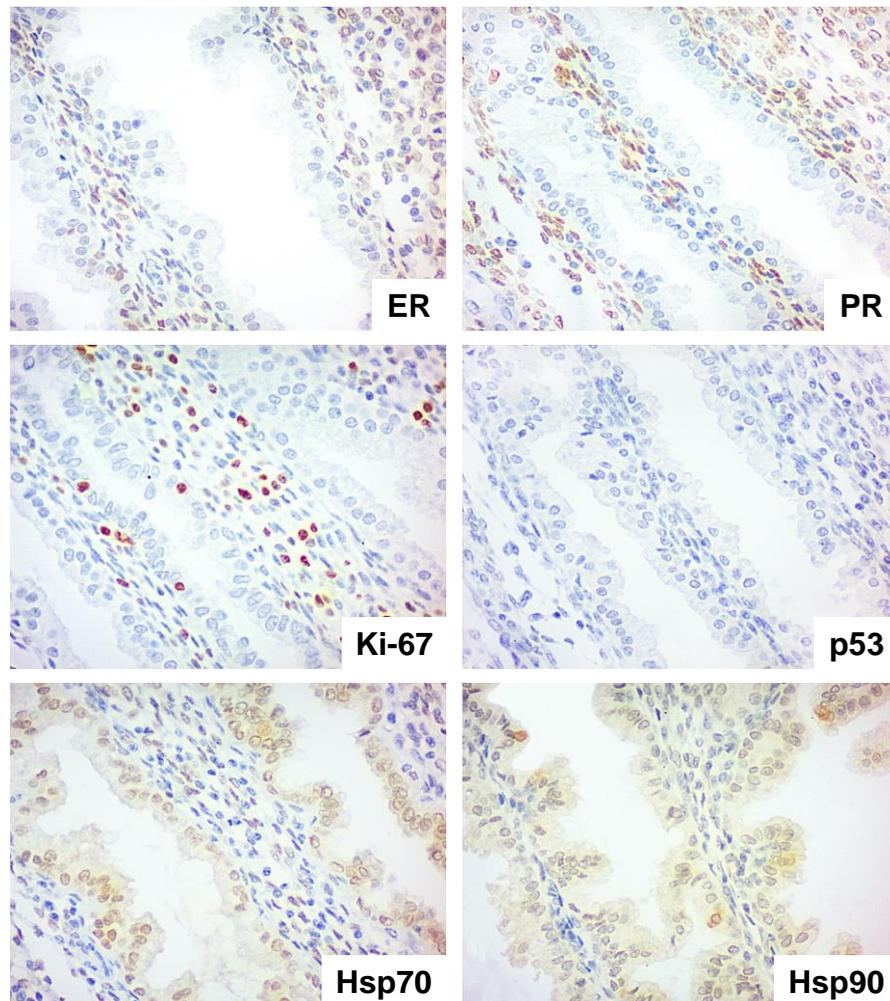


Рисунок 4.2 – Нормальний ендометрій фази секреції. Наявна майже повна відсутність експресія ER та PR, слабка ядерна експресія Ki-67, відсутність експресії p53, помірно виражена ядерно-цитоплазматична експресія Hsp70 and Hsp90. Оцінка експресії проводилась виключно у епітеліальному компоненті тканини. Імуногістохімічне дослідження of ER, PR, Ki-67, p53, Hsp70 and Hsp90. Збільшення x400.

Ядерно-цитоплазматична експресія Hsp70 and Hsp90 виявлена в обох фазах менструального циклу (рис. 4.1-4.2 – нижня панель). При цьому спостерігалась тенденція до зниження інтенсивності сигналу для Hsp90 та посилення сигналу для Hsp70 у середню та пізню фази секреції. Нами не виявлено залежності експресії шаперонів від фаз менструального циклу, рівня проліферативної активності клітин та чутливості ендометрію до жіночих статевих гормонів ($p > 0,05$). Більш інтенсивна реакція спостерігалась у цитоплазматичному патерні епітеліальних клітин, ніж у ядрі.

У тканині ЕК виявлена варіабельна експресія ER та PR у неопластичних клітинах, яка спостерігалась у всіх випадках пухлини. Слід зазначити, що grade 1 ЕК мали більш виражену експресію ER та PR, з поступовим їх зменшенням при дедиференціюванні (grade 1 → grade 2 → grade 3) карцином ($p < 0,05$) (рис. 4.3 – верхня панель).

Протилежно експресії рецепторів до стероїдних гормонів, рівень проліферативної активності залежав від ступеню диференціювання ЕК (у середньому $35,6 \pm 5,4\%$) – виявлена більш виражена експресія у grade 2 та grade 3 пухлинах, а ніж карциномах grade 1 ($p < 0,05$). Експресія p53 виявлялася в поодиноких клітинах low grade ЕК зі зростанням кількості p53-позитивних неопластичних клітин у high grade ЕК (grade 2-3) (рис. 4.3 – середня панель).

Більшість випадків ЕК мали помірну та виражену ядерно-цитоплазматичну експресію Hsp70 та Hsp90 (рис. 4.3 – нижня панель). Дедиференціювання карцином супроводжувалося посиленням інтенсивності експресії рецепторів та кількості рецептор-позитивних клітин ($p < 0,05$). Більш того, прогресування анаплазії пухлинних клітин відображалось на патернах експресії рецепторів – зміщення інтенсивності експресії рецепторів від цитоплазми в напрямку ядер.

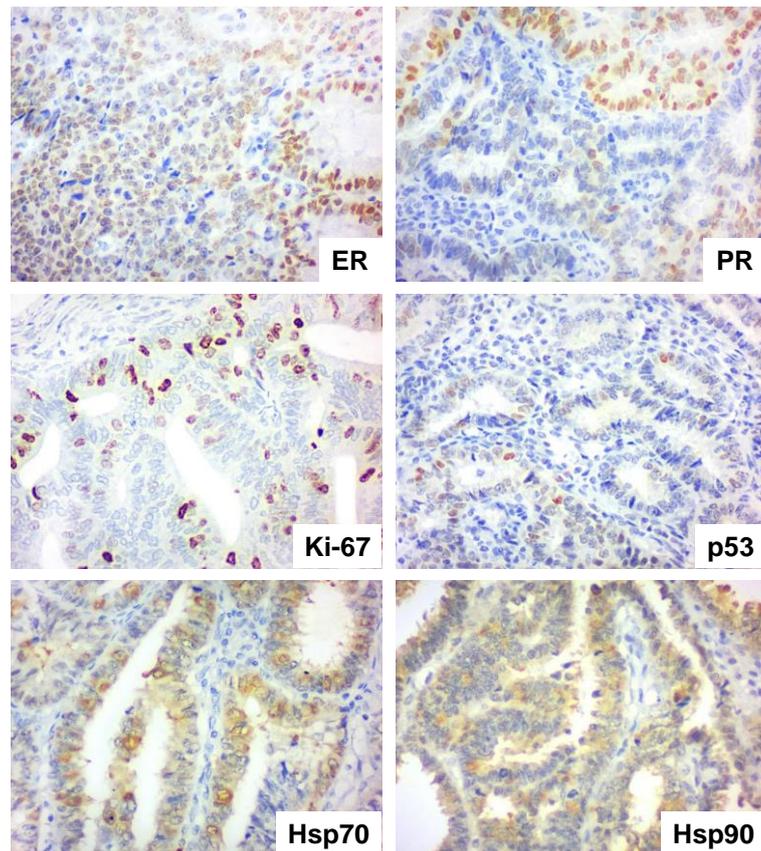


Рисунок 4.3 – Ендометріоїна аденокарцинома. Наявна виражена експресія ER та помірною експресією PR, помірною експресією Ki-67, експресією p53 в поодиноких пухлинних клітинах, помірною ядерно-цитоплазматичною експресією Hsp70 and Hsp90. Оцінка експресії проводилась виключно у епітеліальному компоненті тканини пухлин. Імуногістохімічне дослідження of ER, PR, Ki-67, p53, Hsp70 and Hsp90. Збільшення x400.

Однак, СК and СКК мали більш відмінну експресію рецепторів. Так, тканина СК була у переважній більшості випадків ER- та PR-негативною (рис. 4.4 – верхня панель). Лише в окремих випадках виявлено вогнища їх експресії. Натомість, рівень проліферативної активності клітин значно перевищував як показники норми, так їх рівень у ЕК ($p < 0,05$). Позитивна експресія Ki-67 виявлена у $48,7 \pm 9,2\%$ неопластичних клітин. Всі випадки СК були p53-позитивними – позитивна реакція спостерігалась у $82,4 \pm 6,8\%$ клітин карцином (рис. 4.4 – середня панель). Висока шаперонова активність виявлена у всіх випадках пухлин. Окрім цього встановлено, що клітини СК

мають більш виражену ядерну експресію Hsp70 та Hsp90, а ніж цитоплазматичну (рис. 4.4 – нижня панель).

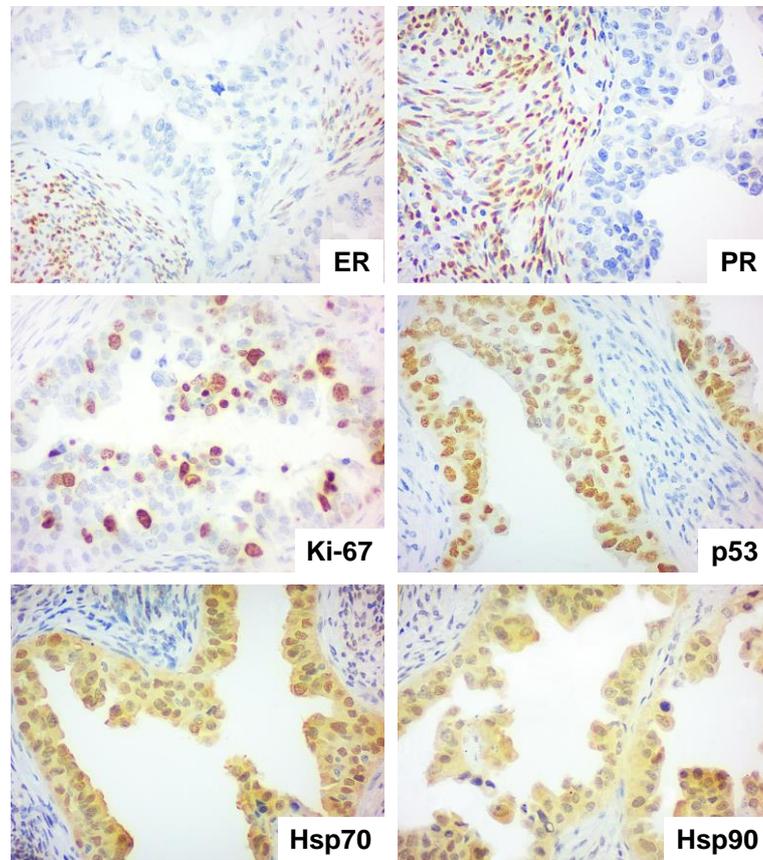


Рисунок 4.4 – Серозна карцинома. Негативна експресія ER та PR, виражена експресія Ki-67 та p53, виражена ядерно-цитоплазматична експресія Hsp70 and Hsp90. Оцінка експресії проводилась виключно у епітеліальному компоненті тканини. Імуногістохімічне дослідження of ER, PR, Ki-67, p53, Hsp70 and Hsp90. Збільшення x400.

Всі випадки СКК були ER- та PR-негативними (рис. 4.5 – верхня панель). Натомість вони мали виражений рівень проліферативної активності клітин (у середньому $52,6 \pm 5,8\%$) та ступінь експресії p53 (у середньому $62,6 \pm 4,4\%$) (рис. 4.5 – середня панель). Аналогічно СК, пухлинні клітини СКК мали інтенсивну експресію обох шаперонів (Hsp70 та Hsp90) зі значним переважанням рецепторного сигналу у ядрах клітин (рис. 4.5 – нижня панель).

Окрім вищезазначеної експресії рецепторів у неопластичних клітинах при оцінці препаратів були виявлені позитивно забарвлені клітини у стромальних компонентах як нормальної, так і неопластичної ендометріальної тканини. Враховуючи поставлені цілі, ми не брали їх до уваги. Вони були індикатором (позитивним внутрішнім контролем) якості проведення імуногістохімічного дослідження. Це було особливо актуально у випадках з негативним рецепторним профілем пухлинних клітин.

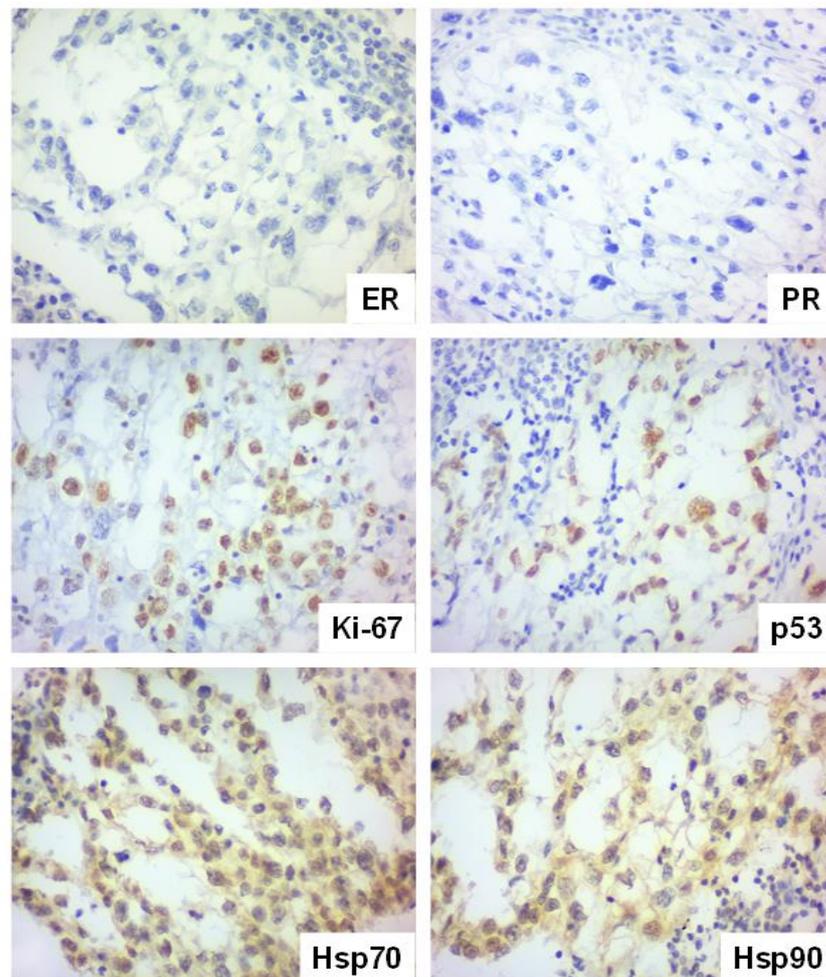


Рисунок 4.5 – Світло-клітинна карцинома. Негативна експресія ER та PR, виражена експресія Ki-67 та p53, виражена ядерно-цитоплазматична експресія Hsp70 and Hsp90. Оцінка експресії проводилась виключно у епітеліальному компоненті тканини. Імуногістохімічне дослідження of ER, PR, Ki-67, p53, Hsp70 and Hsp90. Збільшення x400.

Аналізуючи результати імуногістохімічного дослідження, не виявлено достовірної різниці експресії ER та PR у епітелії нормального ендометрію та неопластичних клітинах ЕК ($p > 0,05$). Натомість, пухлинні клітини СК та СКК мали значно нижчі показники (у переважній більшості вони були абсолютно негативні) експресії рецепторів до стероїдних гормонів порівняно з нормою ($p < 0,05$). Значно нижча експресія ER та PR спостерігалась у СК та СКК порівняно з ЕК ($p < 0,05$). Всі типи ендометріальних карцином мали більш виразну проліферативну активність клітин та експресію p53 ($p < 0,05$). Найвищі показники спостерігалися у СК та СКК. Експресія p53 виявлялась виключно у пухлинних клітинах і була притаманна high grade ЕК, а також СК та СКК.

Експресія Hsp70 and Hsp90 виявлена у всіх випадках як нормальної, так і пухлинної ендометріальної тканини. Неопластична трансформація, дедиференціювання пухлин та підвищення анаплазії ракових клітин (особливо у СК та СКК) супроводжуються зростанням інтенсивності експресії Hsp70 and Hsp90, кількості рецептор-позитивних клітин та переважанням ядерного патерну над цитоплазматичним ($p < 0,05$). Відсутня залежність між чутливістю нормальних та пухлинних клітин до статевих гормонів та шапероновою активністю клітин ($p > 0,05$). Натомість, виявлено зростання експресії Hsp70 and Hsp90 при інтенсифікації проліферативної активності клітин та появі і збільшенні кількості клітин з експресією p53 ($p < 0,05$).

Ендометріальні карциноми є поширеною патологією у жінок, перебіг яких залежить від низки прогностичних факторів [44-46]. Їх прогресування та чутливість до терапії, як і більшості інших карцином органів репродуктивної системи, визначається морфологічними та молекулярно-генетичними особливостями пухлинної тканини [59]. Серед них чутливість до антигормональної терапії (експресія ER та PR) та проліферативно-апоптична

активність клітин (експресія Ki-67 та p53) є найбільш доведеними прогностичними маркерами [59].

Наше дослідження присвячене вивченню експресії Hsp70 and Hsp90 у тканині різних типів ендометріальних карцином (ЕК, СК and СКК) зі встановленням їх прогностичної цінності. Аналогічно раніше отриманим результатам [50,54], нами виявлено експресію обох шаперонів протягом усього менструального циклу. Неопластична трансформація та анаплазія пухлинних клітин супроводжувалися інтенсифікацією експресії Hsp70 and Hsp90. Крім того спостерігається посилення імуногістохімічного сигналу переважно у ядерному патерні ракових клітин. Не зважаючи на доведений синергізм шаперонів та рецепторів до жіночих статевих гормонів [55,56], нами не виявлено кореляційної залежності між їх експресією. Основним підтвердженням різносторонності їх впливу на функціонування ендометріальних клітин стала експресія Hsp70 and Hsp90 у різні фази менструального циклу, які супроводжуються вираженою варіабельністю експресії ER та PR. Інтенсивна експресія шаперонів у високо агресивних ендометріальних карциномах (high grade ЕК, СК and СКК), які мають низьку експресію ER та PR, на нашу думку, більше пов'язана з анаплазією ракових клітин, а ніж варіабельністю експресії рецепторів до жіночих статевих гормонів.

Посилення експресії Hsp70 and Hsp90 у тканині ендометріальних карцином супроводжується інтенсифікацією проліферативної активності клітин (кількості Ki-67-позитивних клітин) та синтезом мутантного p53. Це доводить їх участь у модулюванні поділу клітин та їх ухиленні від апоптозу [50,51]. Саме виражена їх надекспресія у ядрах пухлинних клітин є індикатором залучення Hsp70 and Hsp90 у порушення контролю над апоптозом та поділом клітин.

Слід зазначити, що отримані нами дані мають певні неузгодженості з результатами попередніх досліджень інших науковців, у яких виявлено пригнічення шаперонової активності при дедиференціюванні карцином [54],

а також прогностичну сприятливість експресії Hsp70 and Hsp90 [51]. З одного боку, це може бути пов'язано з унікальністю властивостей цих білків залежно від топографії пухлин. З іншого боку, відмінність отриманих результатів може залежати від формування груп досліджуваного матеріалу, використаних реагентів, особливостей інтерпретації отриманих результатів дослідження. Все це спонукає до продовження дослідження властивостей цих білків.

Підтвердженням спільного функціонування досліджуваних видів шаперонів [53], є встановлена кореляційна залежність між експресіями Hsp70 and Hsp90 у тканині ендометріальних карцином.

Аналіз отриманих результатів показав, що Hsp70 and Hsp90 задіяні у функціонування нормального ендометрію та прогресування ендометріальних карцином. Їх проонкогенна активність корелює з посиленням проліферативної активності пухлинних клітин та ухиленням їх від апоптозу, а також дедиференціюванням карцином. З одного боку, це аргументує необхідність їх визначення у тканині ендометріальних карцином при встановленні імунофенотипу пухлинних клітин та прогнозуванні захворювання. З іншого боку, можливість використання інгібіторів шаперонів актуалізує їх ідентифікацію при таргетному лікуванні злоякісних пухлин ендометрію [60]. Наявність розбіжностей у інтерпретації отриманих результатів спонукає до використання комп'ютеризованого обладнання та залучення інтелектуальних програм для оцінки результатів імуногістохімічного дослідження [61].

5 ОСОБЛИВОСТІ ДІАГНОСТИКИ ПЕРВИННОГО РАКУ МАТКОВИХ ТРУБ ПІД ЧАС І ПІСЛЯ ОПЕРАЦІЇ

Первинний рак маткових труб (РМТ) є рідкісним і складним для діагностики захворюванням. Згідно більшості публікацій і нашими спостереженнями він становить 1,3-1,9% раку жіночих статевих органів і не менше 4-6% раку додатків матки [62]. Крім того, епідеміологічні дослідження відзначають зростання захворюваності РМТ. Наприклад, з 2001 по 2014 рік до 4 разів [63]. До теперішнього часу достовірні діагнози до операції при РМТ коливаються від 0 до 10-15% [62]. Одні автори продовжують вважати цей діагноз операційною знахідкою, інші - більш патологоанатомічним, ніж клінічним [64]. Діагностувати це захворювання не завжди просто навіть під час лапаротомії та лапароскопії. Це підтверджується повідомленнями про 30-50% помилкових діагнозів і під час операцій, так як РМТ часто маскується під доброякісні безневинні гідрогематосальпінкси або інші захворювання [65].

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 [66]. Під час операцій, крім візуального огляду, практично у всіх хворих, проводиться ревізія органів черевної порожнини і регіонарних груп лімфатичних вузлів (ЛВ) шляхом пальпації. Однак, пальпація ЛВ дозволяє виявити не більше 10% макрометастазів у хворих уражених метастазами [67]. В даний час є можливим достовірно діагностувати метастази в ЛВ до операції за допомогою магніторезонансної томографії (МРТ) [68].

Лапароскопію слід віднести до субопераційних методів діагностики. У доступній літературі мається стаття М. Sun і співавт. (2019) про 16 діагностичних лапароскопій при РМТ [64]. Крім того, іншими авторами описані 8 поодиноких спостережень застосування лапароскопії для діагностики цієї пухлини [69,70]. В одному з цих повідомлень РМТ виявився

випадковою знахідкою при втручанні з метою стерилізації, а у 7 хворих – лапароскопія застосована як уточнююче дослідження після виявлення іншими методами незрозумілих додаткових утворень або метастазів пухлини без виявленого первинного осередку. У 17 (70,8%) хворих з початковими формами РМТ, з 24 обстежених, після застосування діагностичної лапароскопії помилково встановлені діагнози доброякісних кістозних утворень додатків матки [64].

Останнім часом в онкогінекології при лапароскопічних операціях активно впроваджуються методи візуалізації лімфатичної системи на тлі флюоресценції маркера індоціаніна 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 мікрометастази, причому чутливість, специфічність і точність методики досягає 93,8%, 100% і 98,7% відповідно [71]. 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 [72], 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 [73].

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 трубці, 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. 5.1).

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.

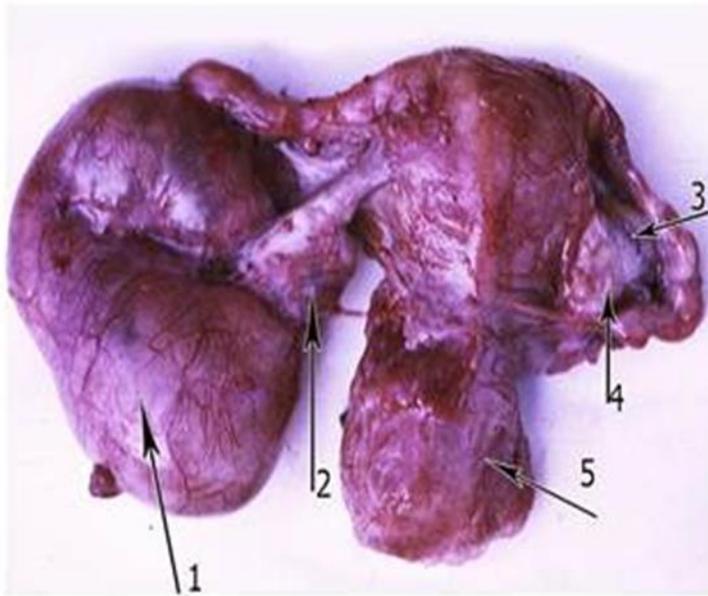


Рисунок 5.1 – Матка з придатками: 1 – ліва маткова труба з «гідросальпінксом» у вигляді звивистої реторти; 2 – лівий яєчник; 3-права маткова труба; 4-правий яєчник; 5 – шийка матки. Оригінальний вигляд.

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. 5.2). 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.

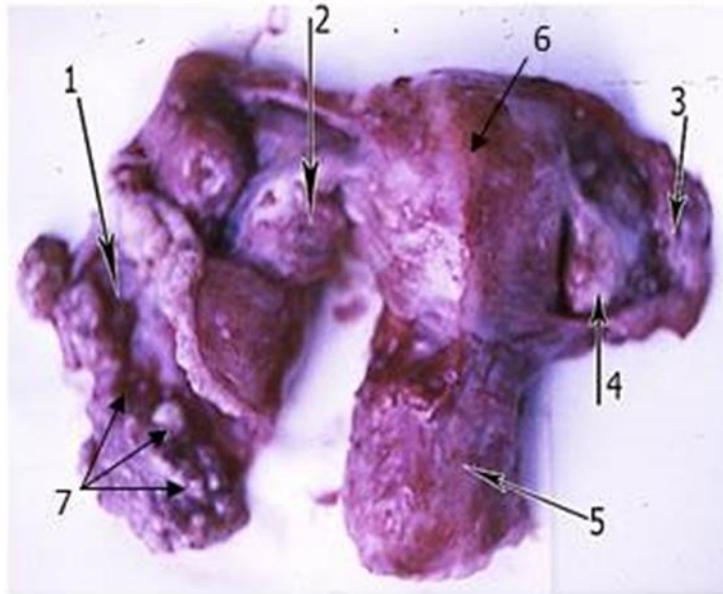


Рисунок 5.2 – Матка з придатками: 1 – ліва маткова труба; 2 – лівий яєчник; 3-права маткова труба; 4-правий яєчник; 5 – шийка матки; 6 – матка; 7 – ампулярний відділ лівої маткової труби з множинними папілярними розростаннями пухлини. Оригінальний вигляд.

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. Виявилось, 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. Виявилось, 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 [72]. 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 виявилось, що у 5 хворих яєчники розпластані на капсулі великої ковбасовидної труби, а у трьох - були замуrowані 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 злоякісності (рис. 5.3–1). Основою визначення диференціювання служила структурна перебудова пухлинної тканини і атипія ядер епітеліальних клітин. Пухлини високого ступеня злоякісності (high-grade), що включали низько- і помірно диференційовані карциноми (G2, G3) і пухлини низького ступеня злоякісності (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.

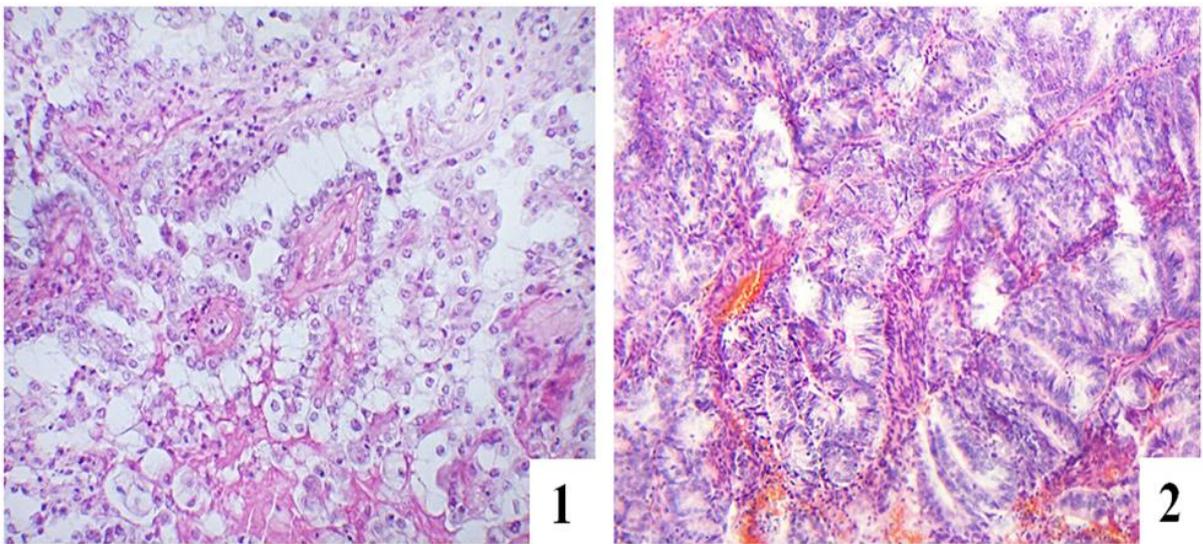


Рисунок 5.3 – Аденокарцинома маткової труби: 1 – серозна аденокарцинома високого ступеня злоякісності; 2 – помірнодиференційована (G2) ендометріюдна аденокарцинома. Забарвлення гематоксилін-еозином.

Збільшення: $\times 200$

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 злоякісних 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 злоякісності (рис. 5.4).

Подальше використання маркерів СК7, СК20 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 СК7 і СК 20, негативна експресія CDX-2 дала можливість встановити первинну локалізацію муцинозної карциноми в матковій трубці (рис. 5.4).

Серед обстежених 105 хворих РМТ також виявлено 12 (11,4%) випадків ендометріодної аденокарциноми (рис. 5.3–2), два (1,9%) - муцинозної аденокарциноми та по одному випадку карциносаркоми, світлоклітинної, плоскоклітинної карциноми і нейроендокринної пухлини. Ендометріодні 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.

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.

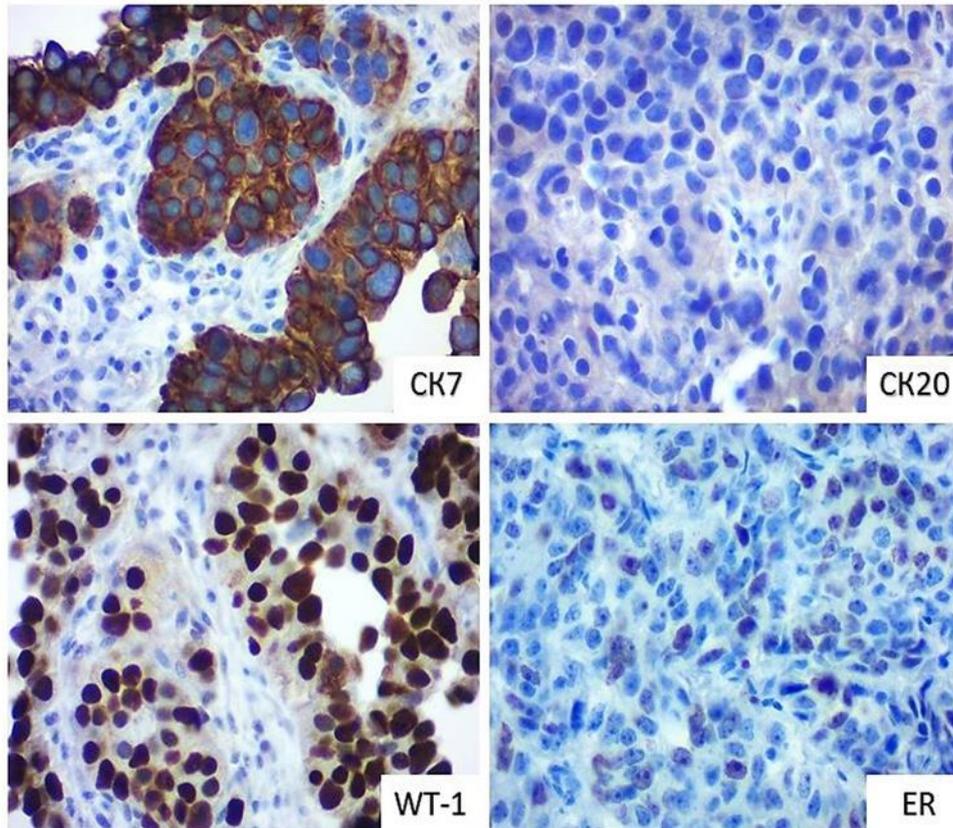


Рисунок 5.4 – Серозна аденокарцинома маткової труби. Імуногістохімічне забарвлення: CK7, CK20, WT-1, ER. Збільшення: $\times 400$.

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 [64,69]. 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 [64]. 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 [74].

Програма лікування, обсяг операції і виживаність хворих РМТ значною мірою залежать від адекватності стадіювання [62,64]. 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 макromетастази, які і при других пухлинах жіночих статевих органів, згідно результатів дослідження ряду авторів, виявляються менше ніж у 10% хворих з метастазами [67].

При відсутності можливості визначити під час операції стан сторожових ЛУ методом флюоресцентної візуалізації з ближнього інфрачервоного випромінювання на тлі індоціаніну зеленого [71], 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%) [68]. На жаль, через рідкісну доопераційну діагностику РМТ, це далеко не завжди можливо [62,64].

Практично, в зв'язку з великою лімфотропністю пухлини, всім хворим РМТ показана лімфаденектомія [75]. 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 [76]. 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 [62,73,76].

ВИСНОВКИ

1. Інвазивний плоскоклітинний рак шийки матки є однією з найросповсюдженіших та агресивних злоякісних пухлин жіночих статевих органів. Він характеризується варіабельністю гістологічної будови пухлин при їх дедиференціюванні. 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.

2. Інвазивний рак неспецифічного типу з медулярним компонентом має значну кількість прогностично-несприятливих морфологічних та імуногістохімічних особливостей, які нівелюються наявністю виражених протективних властивостей пухлинних клітин та якісними характеристиками пухлинного мікрооточення. Це призводить до сприятливого перебігу карцином при відносно несприятливих особливостях ракових клітин.

3. 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 ендометріїдних аденокарцином може бути індикатором неопластичної трансформації та прогресування злоякісного процесу.

4. Наші результати демонструють участь Hsp70 and Hsp90 у прогресуванні різних типів ендометріальних карцином. Посилення їх експресії у ракових клітинах корелюється з інтенсифікацією проліферативної активності, експресією p53 та анаплазією клітин. Їх одночасна та односпрямована активізація у пухлинній тканині не залежить від рівня

експресії ER та PR. Варіабельність експресії Hsp70 and Hsp90 у ендометріальних карциномах актуалізує необхідність їх додавання до діагностичних панелей з наступною персоніфікацією лікування хворих.

5.3 метою поліпшення діагностики PMT під час лапароскопій, особливо під маскою гідро-гематосальпінксів, необхідні кооперовані дослідження для вивчення лапароскопічної семіотики початкових форм цієї пухлини. Представлені нами порівняно задовільні результати діагностики під час операцій і після – результат чіткого дотримання вимог при ревізії органів черевної порожнини, вивчення видалених препаратів і застосування, в сумнівних випадках, субопераційних морфологічних досліджень.

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.

11. 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.

12. 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.

13. 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.

14. 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.

15. 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.

16. 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.

17. 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.

18. 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.

19. Beauchemin N, Arabzadeh A. Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules (CEACAMs) in cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2013 Dec;32(3.4):643-71.

20. 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.

21. Kuespert K, Pils S, Hauck CR. CEACAMs: their role in physiology and pathophysiology. *Curr Opin Cell Biol.* 2006 Oct;18(5):565-71.

22. Kim WM, Huang YH, Gandhi A, Blumberg RS. CEACAM1 structure and function in immunity and its therapeutic implications. *Semin Immunol.* 2019;42:101296. DOI: 10.1016/j.smim.2019.101296.

23. Lyndin MS, Romanyuk AM, Sikora VV, Zinher BB. 13. Molekuly klitynnoyi adheziyi rakovo-embriional'noho antyhenu (CEACAMs). Sumy: SumDU; 2020. 219 s. [in Ukrainian].

24. 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 Feb 4. doi: 10.3322/caac.21660.

25. Breast Tumours. WHO Classification of Tumours, 5th Edition, Volume 2. WHO Classification of Tumours Editorial Board. IARC: Lyon 2019. 356 p.

26. Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ et al. eds. World Health Organization classification of tumours of the breast. 4th ed. Lyon: IARC Press, 2012.

27. Tan PH, Ellis I, Allison K, Brogi E, Fox SB, Lakhani S, Lazar AJ, Morris EA, Sahin A, Salgado R, Sapino A, Sasano H, Schnitt S, Sotiriou C, van Diest P, White VA, Lokuhetty D, Cree IA; WHO Classification of Tumours Editorial Board. The 2019 World Health Organization classification of tumours of the breast. *Histopathology.* 2020 Aug;77(2):181-185. doi: 10.1111/his.14091.

28. Romaniuk A, Lyndin M, Sikora V, Lyndina Y, Panasovska K. Histological and immunohistochemical features of medullary breast cancer. *Folia Med Cracov.* 2015;55(2):41-8.

29. Lim KH, Telisinghe PU, Abdullah MS, Ramasamy R. Possible significance of differences in proportions of cytotoxic T cells and B-lineage cells in the tumour-infiltrating lymphocytes of typical and atypical medullary carcinomas of the breast. *Cancer Immun.* 2010 Jan 22;10:3.

30. Martinez SR, Beal SH, Canter RJ, Chen SL, Khatri VP, Bold RJ. Medullary carcinoma of the breast: a population-based perspective. *Med Oncol.* 2011 Sep;28(3):738-44. doi: 10.1007/s12032-010-9526-z.

31. Romaniuk A, Lyndin M. Immune microenvironment as a factor of breast cancer progression. *Diagn Pathol.* 2015 Jun 26;10:79. doi: 10.1186/s13000-015-0316-y.

32. Weigel MT, Dowsett M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. *Endocr Relat Cancer.* 2010 Sep 23;17(4):R245-62. doi: 10.1677/ERC-10-0136.

33. Jeong H, Hwang I, Kang SH, Shin HC, Kwon SY. Tumor-Associated Macrophages as Potential Prognostic Biomarkers of Invasive Breast Cancer. *J Breast Cancer.* 2019 Jan 2;22(1):38-51. doi: 10.4048/jbc.2019.22.e5.

34. Breast Tumours. WHO Classification of Tumours, 5th Edition, Volume 2. WHO Classification of Tumours Editorial Board. IARC: Lyon 2019. 356 p.

35. 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.

36. Murali R, Davidson B, Fadare O, et al. High-grade Endometrial Carcinomas: Morphologic and Immunohistochemical Features, Diagnostic Challenges and Recommendations. *Int J Gynecol Pathol.* 2019;38 Suppl 1(Iss 1 Suppl 1):S40-S63. doi:10.1097/PGP.0000000000000491

37. Cree IA, White VA, Indave BI, Lokuhetty D. Revising the WHO classification: female genital tract tumours. *Histopathology.* 2020 Jan;76(1):151-156. doi: 10.1111/his.13977. PMID: 31846528.

38. 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
39. Benchimol S., Fuks A., Jothy S., Beauchemin N., Shiota K., Stanners C. P. Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule. *Cell*. 1989;57(2):327–34.
40. 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.
41. 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.
42. 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.
43. 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.
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 Feb 4. doi: 10.3322/caac.21660.
45. Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington CS, Young RH. (Eds.): WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs. IARC: Lyon 2014. 307 p.
46. 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.

47. Neuer A, Spandorfer SD, Giraldo P, Dieterle S, Rosenwaks Z, Witkin SS. The role of heat shock proteins in reproduction. *Hum Reprod Update*. 2000 Mar-Apr;6(2):149-59. doi: 10.1093/humupd/6.2.149.

48. Yun CW, Kim HJ, Lim JH, Lee SH. Heat Shock Proteins: Agents of Cancer Development and Therapeutic Targets in Anti-Cancer Therapy. *Cells*. 2019 Dec;9(1). DOI: 10.3390/cells9010060.

49. Sauvage F., Messaoudi S., Fattal E., Barratt G., Vergnaud-Gauduchon J. Heat shock proteins and cancer: How can nanomedicine be harnessed? *J. Control. Release*. 2017;248:133–143. doi: 10.1016/j.jconrel.2017.01.013.

50. Tabibzadeh S, Broome J. Heat shock proteins in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 1999;7(1-2):5-9. doi:10.1155/S1064744999000022

51. Ciocca DR, Calderwood SK. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones*. 2005;10(2):86-103. doi:10.1379/csc-99r.1

52. Calderwood S.K., Gong J. Heat Shock Proteins Promote Cancer: It's a Protection Racket. *Trends Biochem. Sci*. 2016;41:311–323. doi: 10.1016/j.tibs.2016.01.003.

53. Noordhuis P., Holwerda U., Van der Wilt C.L., Van Groeningen C.J., Smid K., Meijer S., Pinedo H.M., Peters G.J. 5-Fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to thymidylate synthase inhibition of human colorectal cancers. *Ann. Oncol*. 2004;15:1025–1032. doi: 10.1093/annonc/mdh264

54. Wataba K, Saito T, Fukunaka K, Ashihara K, Nishimura M, Kudo R. Over-expression of heat shock proteins in carcinogenic endometrium. *Int J Cancer*. 2001 Feb 15;91(4):448-56. doi: 10.1002/1097-0215(200002)9999:9999.

55. Spears PA, Barnes JA 2003 HSP70 enhances MCF-7 cell growth and estrogen receptor activity. *Proc 1st Int Cong Stress Responses Biol Med Quebec*, September 10–14. pp. 73.

56. Nanbu K, Konishi I, Komatsu T, Mandai M, Yamamoto S, Kuroda H, et al. Expression of heat shock proteins HSP70 and HSP90 in endometrial carcinomas. Correlation with clinicopathology, sex steroid receptor status, and p53 protein expression. *Cancer* 1996; 77: 330– 8.

57. Romaniuk A, Lyndin M. Immune microenvironment as a factor of breast cancer progression. *Diagn Pathol.* 2015 Jun 26;10:79. doi: 10.1186/s13000-015-0316-y. PMID: 26112049; PMCID: PMC4480440.

58. Firouzeh Heidari, Soghra Rabizadeh, Salome Sadat Salehi, Setare Akhavan, Pegah Khaloo, Hamid Alemi, Hossein Mirmiranpour, Alireza Esteghamati & Manouchehr Nakhjavani (2020) Serum HSP70 level in patients with endometrial cancer with and without diabetes, *Gynecological Endocrinology*, 36:4, 351-355, DOI: 10.1080/09513590.2019.1648415

59. Hyriavenko N, Lyndin M, Sikora K, et al. Serous Adenocarcinoma of Fallopian Tubes: Histological and Immunohistochemical Aspects. *J Pathol Transl Med.* 2019;53(4):236-243. doi:10.4132/jptm.2019.03.21

60. Du X.L., Jiang T., Wen Z.Q., Gao R., Cui M., Wang F. Silencing of heat shock protein 70 expression enhances radiotherapy efficacy and inhibits cell invasion in endometrial cancer cell line. *Croat. Med. J.* 2009;50:143–150. doi: 10.3325/cmj.2009.50.143.

61. Gargin V, Radutny R, Titova G, 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, стр. 469–473, 9088898898

62. Lau, H. Y., Chen, Y. J., Yen, M. S., et al. “Primary fallopian tube carcinoma: a clinicopathologic analysis and literature review.” *Journal of the Chinese Medical Association* : *JCMA* 76.10 (2013): 583-7. DOI: 10.1016/j.jcma.2013.06.010

63. Shin, W., Won, Y. J., Yoo, C. W., et al. “Incidence trends for epithelial peritoneal, ovarian, and fallopian tube cancer during 1999-2016: a retrospective

study based on the Korean National Cancer Incidence Database.” *Journal of gynecologic oncology* 31.4 (2020): e56. DOI: 10.3802/jgo.2020.31.e56

64. Sun, M., Bao, L., Shen, H., et al. “Unexpected primary fallopian tube carcinoma during gynecological operations: Clinicopathological and prognostic factors analyses of 67 cases.” *Taiwanese journal of obstetrics and gynecology* 58.5 (2019): 626-32. DOI: 10.1016/j.tjog.2019.07.008

65. Romaniuk, A., Gyryavenko, N., Lyndin, M., et al. “A rare case of tuberculous salpingitis.” *Interventional medicine and applied science* 8.3 (2016): 131-4. DOI: 10.1556/1646.8.2016.3.2

66. Purbadi, S., Santawi, V. P., Tjahjadi, H., et al. “Case report: Unpredictable nature of tubal cancer.” *Annals of Medicine and Surgery* 51 (2020): 44-7. DOI: 10.1016/j.amsu.2020.01.002

67. Creasman, W. “Surgical Treatment of Endometrial Carcinoma.” *The Global Library of Women’s Medicine’s* (2011) [Internet]. [cited 2021 Jan 18]. DOI: 10.3843/GLOWM.10239. Available from: <https://www.glowm.com/section-view/heading/surgical-treatment-of-endometrial-carcinoma/item/239#.YF3k3FUza70>

68. Koplay, M., Dogan, N. U., Erdogan, H., et al. “Diagnostic efficacy of diffusion-weighted MRI for pre-operative assessment of myometrial and cervical invasion and pelvic lymph node metastasis in endometrial carcinoma.” *Journal of medical imaging and radiation oncology* 58.5 (2014): 538-46; DOI: 10.1111/1754-9485.12209

69. Oguchi, H., Kishigami, Y., Miyazaki, N., et al. “Fallopian Tube Cancer Diagnosed by Laparoscopy: Case Report.” *Japanese journal of gynecologic and obstetric endoscopy* 29.1 (2013): 177-83. DOI: 10.5180/jsgoe.29.177

70. Takano, M., Kagawa, Y., Murata, S., et al. “Fallopian tube cancer incidentally diagnosed during laparoscopy for metastatic adenocarcinoma of unknown primary lesion.” *Gynecology and Minimally Invasive Therapy* 5.4 (2016): 166-9. DOI: 10.1016/j.gmit.2015.06.007

71. Plante, M., Touhami, O., Trinh, X. B., et al. "Sentinel node mapping with indocyanine green and endoscopic near-infrared fluorescence imaging in endometrial cancer. A pilot study and review of the literature." *Gynecologic oncology* 137.3 (2015): 443-7. DOI: 10.1016/j.ygyno.2015.03.004

72. Kar, A., Kar, T., Dha, I., Panda, S. "Squash cytodiagnosis of synchronous papillary serous carcinoma of ovary and endometrium with demonstration of serous tubal intraepithelial carcinoma as a precursor lesion." *Indian journal of pathology and microbiology* 60.1 (2017): 125-127. DOI: 10.4103/0377-4929.200039

73. Romaniuk, A., Gyryavenko, N., Lyndin, M., et al. "Primary cancer of the fallopian tubes: histological and immunohistochemical features." *Folia medica Cracoviensia* 56.4 (2016): 71-80.

74. Zivanovic, O., Sonoda, Y., Diaz, J. P., et al. "The rate of port-site metastases after 2251 laparoscopic procedures in women with underlying malignant disease." *Gynecologic oncology* 111.3 (2008): 431-7. DOI: 10.1016/j.ygyno.2008.08.024

75. Koo, Y. J., Kwon, Y. S., Lim, K. T., et al. "Para-aortic lymphadenectomy for primary fallopian tube cancer." *International journal of gynaecology and obstetrics* 112.1 (2011): 18-20. DOI: 10.1016/j.ijgo.2010.07.025

76. Nofech-Mozes, S., Khalifa, M. A., Ismiil, N., et al. "Immunophenotyping of serous carcinoma of the female genital tract." *Modern pathology* 21.9 (2008): 1147-55. DOI: 10.1038/modpathol.2008.108