

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

УКПП

№ держреєстрації № 0121U100472

Інв. №

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

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

_____ 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

**ДОСЛІДЖЕННЯ СТАБІЛЬНОСТІ ФЛЮОРОФОР-КОН'ЮГОВАНИХ
АНТИТІЛ ТА ЇХ ЕФЕКТИВНОСТІ В ІДЕНТИФІКАЦІЇ
НЕОПЛАСТИЧНИХ КЛІТИН
(проміжний)**

Науковий керівник
канд.мед наук, доцент

М.С. Линдін

2022

Рукопис закінчено 23 грудня 2022 р.

Результати роботи розглянуто науковою радою СумДУ, протокол №_ від __ грудня 2022 р.

СПИСОК АВТОРІВ

Керівник НДР, гол. наук. співроб., канд. мед. наук	<hr/> (22.12.2022)	Линдін М.С. (розділ 1,2,3)
Відповідальний виконавець, ст.наук. співроб., канд. мед. наук	<hr/> (22.12.2022)	Сікора В.В. (розділ 1,2,3)
Молодший наук. співроб., канд. мед. наук	<hr/> (22.12.2022)	Кравченко Я.О. (розділ 1)
Виконавець, доктор. мед. наук	<hr/> (22.12.2022)	Москаленко Р.А. (розділ 2,3)
Виконавець, доктор. мед. наук	<hr/> (22.12.2022)	Кузенко Є.В. (розділ 1,2)
Ст. наук. співроб., канд. мед. наук	<hr/> (22.12.2022)	Линдіна Ю.М. (розділ 2,3)
Наук. співроб., канд. мед. наук	<hr/> (22.12.2022)	Олешко О.М. (розділ 2)
Молодший наук. співроб.	<hr/> (22.12.2022)	Сікора К.О. (розділ 2,3)
Виконавець, канд. мед. наук	<hr/> (22.12.2022)	Гирявенко Н.І. (розділ 3)
Молодший наук. співроб., канд. мед. наук	<hr/> (22.12.2022)	Дейнека В.М. (розділ 2)

Наук. співроб., канд. мед. наук	<hr/> (22.12.2022)	Олешко Т.Б. (розділ 3)
Виконавець	<hr/> (22.12.2022)	Сорока Ю.А. (розділ 1)
Виконавець	<hr/> (22.12.2022)	Сікора Я.В. (розділ 3)
Лаборант	<hr/> (22.12.2022)	Янко І.К. (розділ 3)
Виконавець	<hr/> (22.12.2022)	Цепоко Д.Г. (розділ 3)
Лаборант	<hr/> (22.12.2022)	Рощупкін А.А. (розділ 2)
Лаборант	<hr/> (22.12.2022)	Золотарьова В.Г. (розділ 2)

РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 76 с., 22 рис., 2 табл., 153 джерела.

ЕНДОМЕТРІОЇДНА АДЕНОКАРЦИНОМА, ІМУНОГІСТОХІМІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ, НЕОАНГІОГЕНЕЗ, ФЛЮОРОФОР-КОН'ЮГОВАНІ АНТИТІЛА.

Об'єкт дослідження – злоякісні пухлини основних локалізацій.

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

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

Для досягнення поставленої мети були визначені такі завдання:

- Дослідити *in vitro* взаємодію флюорофор-кон'югованих анти-СЕАСАМ антитіл з клітинами злоякісних пухлин;
- Встановити особливості взаємодії флюорофор-кон'югованих анти-СЕАСАМ антитіл з різними типами пухлинних клітин;
- Визначити оптимальні концентрації флюорофор-кон'югованих анти-СЕАСАМ антитіл для індикації неопластичних клітин;
- Дослідити стійкість комплексу «клітина-флюоресцентна мітка»

Методи дослідження – гістологічне (зabarвлення 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 пухлинної тканини, визначення впливу молекул клітинної адгезії на морфологічні та молекулярно-генетичні особливості карцином.

ЗМІСТ

1 Дослідження впливу ЦОГ2 на прогресію карцином ендометрію-----	6
2 Залежність мікросудинної щільності карцином тіла матки від гістологічних та імуногістохімічних особливостей пухлин -----	21
3 Особливості флуоресцентної візуалізації злоякісних пухлин-----	31
3.1 Інтеропераційна візуалізація новоутворень комбінацією радіоактивної мітки та флуоресцентного сигналу-----	34
3.2 Клінічно доступні методи флюоресцентної візуалізації-----	36
3.3 Широкозастосовні та доступні для клінічного використання флуоресцентні візуалізаційні зонди-----	41
3.4 Нові зонди флуоресцентної візуалізації-----	50
4 Висновки-----	54
Перелік джерел посилання-----	56

1 ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ЦОГ2 НА ПРОГРЕСІЮ КАРЦИНОМ ЕНДОМЕТРІЮ

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

Група ЦОГ включає три представники: ЦОГ1, ЦОГ2 та ЦОГ3 [7]. На сьогоднішній день особлива увага прикута до ЦОГ2 у зв'язку з-за можливості шляхом їх блокування впливати на перебіг злоякісних пухлин [8]. Цей білок, який відкрито у 1991 році [9], каталізує реакції по утворенню простаноїдів (простагландин Е2 – PGE2), які мають виражений проканцерогенний ефект [10]. У нормі базальну експресію COX2 виявлено у шлунку, нирках, нервовій системі та жіночих статевих органах [11]. Серед різних гістологічних типів карцином (плоскоклітинний рак, перехідноклітинний рак, холангіокарцинома, гепатокарцинома) їх експресію виявлено також у АЕ [12]. Це може бути індикатором неопластичної трансформації нормальних клітин у пухлинні [13]. Надекспресія COX2 призводить до погіршення прогнозу, супроводжуючись зростанням рецидивування та метастазування пухлин,

зниженням виживаності та підвищенням резистентності до хіміотерапії [8, 14]. При цьому відбувається стимуляція пухлинних клітин до росту, їх виживаності та інвазії; активується ангиогенез та зростає мікросудинна щільність (МСЩ) у неопластичній тканині [8, 15, 16].

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

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

Низьку цитоплазматичну експресію ЦОГ2 виявлено у нормальному ендометрії фази проліферації [29]. При цьому спостерігається елевація експресії ЦОГ2 при гіперплазії ендометрію [30], ендометритах [31] та ЕС [34]. У пухлинах ендометрію ЦОГ2 модулює ангиогенез, міграцію, інвазивність та

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

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

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

У цій статті ми вперше показуємо залежність експресії ЦОГ2 від гістологічних особливостей АЕ, вплив ЦОГ2 на експресію прогностично-важливих білків у тканинах ЕАЕ, САЕ та СКАЕ. Нами доведено, що варіабельність експресії ЦОГ2 проявляється на якісних характеристиках неопластичних клітин та пухлинного мікрооточення. Зростання вмісту ЦОГ2 у клітинах АЕ призводить до прогресування та набуття ними більш агресивних властивостей.

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

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

Імуногістохімічне дослідження та візуалізацію білків проводили згідно з рекомендаціями виробника системи детекції. Основні етапи цієї методики детально описані в нашій попередній публікації [42]. В імуногістохімічному дослідженні використовували кролячі поліклональні антитіла до ЦОГ2 («Diagnostic BioSystems»); кролячі моноклональні антитіла до ER (клон SP1), PR (клон YR85), Ki-67 (клон SP6) і EGFR (клон EP38Y) («Thermo Scientific»); мишачі моноклональні антитіла до p53 (клон SP5) та bcl-2 (клон 100/D5) («Thermo Scientific»); кролячі поліклональні антитіла до VEGF і MMP1 («Thermo Scientific»); мишачі моноклональні антитіла до CD31 (клон 1A10) («Біо-Рад»); кролячі моноклональні антитіла до CD163 (клон EP324) («Master Diagnostica»).

Три патологоанатоми незалежно проаналізували результати гістологічного та імуногістохімічного забарвлення. Щоб визначити структуру експресії Bcl-2, EGFR, MMP1 та VEGF, ми використали спрощену тривірневу

систему оцінки: «←» для негативної експресії, «+» для низької експресії, «++» для помірної експресії та «+++» для сильної експресії (0 – 5%, 5 – 25%, 26 – 50% і > 50% позитивних клітин відповідно). Патерн експресії p53 реєстрували як позитивне або негативне фарбування. Для експресії ER, PR і Ki-67 ми реєстрували відсоток рецептор-позитивних клітин серед загальної кількості пухлинних клітин. МСЦ і кількість CD163-позитивних клітин (M2-макрофагів) визначали в трьох полях зору при збільшенні $\times 200$.

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

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

Обробку даних проводили за допомогою пакету статистичних програм GraphPad Prism® версії 6.0. Ми розраховували середнє арифметичне (M) і стандартне відхилення (SD). Оцінку відмінностей між порівнюваними показниками проводили за допомогою Манна-Уїтні (u). Значущість відмінностей між трьома групами визначали за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) з апостеріорним тестом Бонферроні. Виявлення та оцінка кореляційних зв'язків між показниками здійснювалась за непараметричним коефіцієнтом кореляції Спірмена (r). P-значення 0,05 (95% достовірність) вважалося статистично значущим.

Характеристика груп пацієнтів

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

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

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

Гістологічна характеристика пухлинної тканини

Тканіна ЕАЕ демонструвала залозисту архітектуру, вистелену багат шаровим стовпчастим епітелієм зі скупченою, складною, розгалуженою архітектурою [43]. Пухлинні клітини щільно прилягають одна до однієї,

утворюючи плавні контури залозистих просвітів. Вони переважно мають еозинофільну цитоплазму, різний ступінь ядерного атипізму та високий мітотичний індекс. У залежності від площі, зайнятої солідним ростом, АЕА поділялися на 1 ступінь (пухлини, що складаються з менш ніж 5% солідного росту) (рис. 1.2), ступінь 2 (пухлини, що мають площу, що складає 6 – 50% солідного росту) та ступінь 3 (пухлини мають більш ніж 50% солідного росту) (рис. 1.3). Слід зазначити, що при ядерній атипії 3 пухлинний клас збільшився на одну позицію. Серед 30 років АЕА сім зразків відповідали 1 ступеню, 16 – 2 ступеню, та 7 – 3 ступеню.

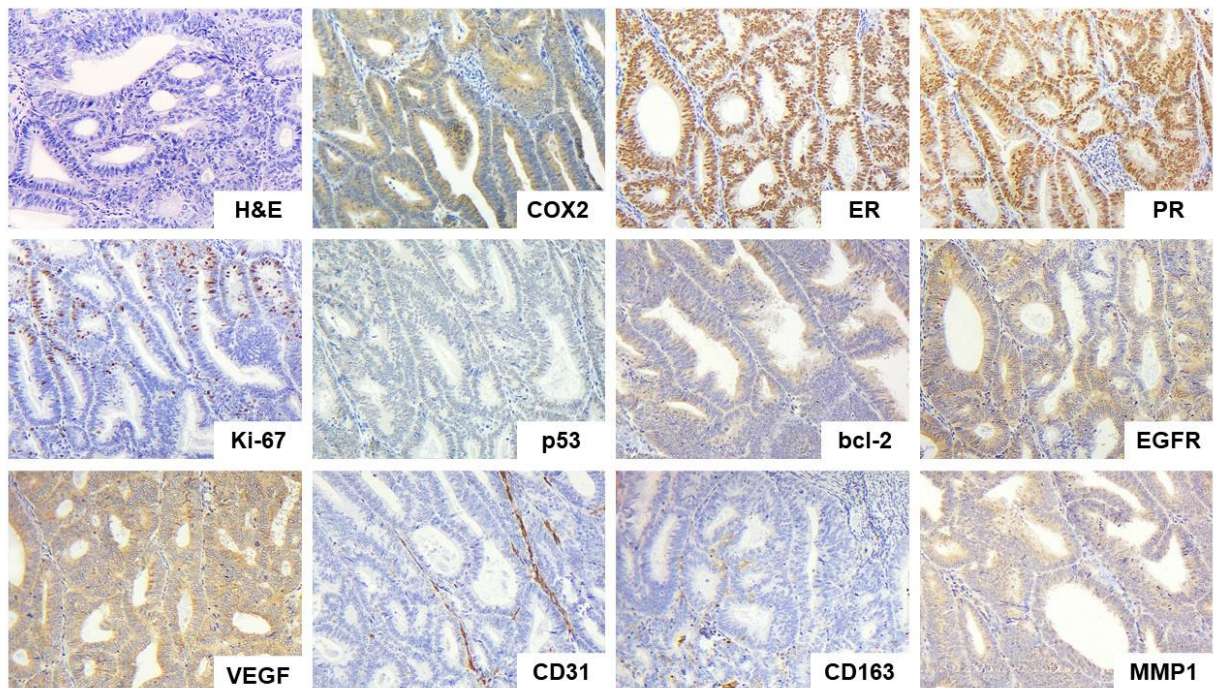


Рисунок 1.2 – Ендометриїдна карцинома ендометрію, ступінь 1. Фарбування гематоксиліном та еозином (H&E). Тканини ЕАЕ з експресією ЦОГ2, ER, PR, Ki-67, p53, bcl-2, EGFR, VEGF, CD31, CD163 і MMP1, виявлені за допомогою імуногістохімії. Збільшення x200.

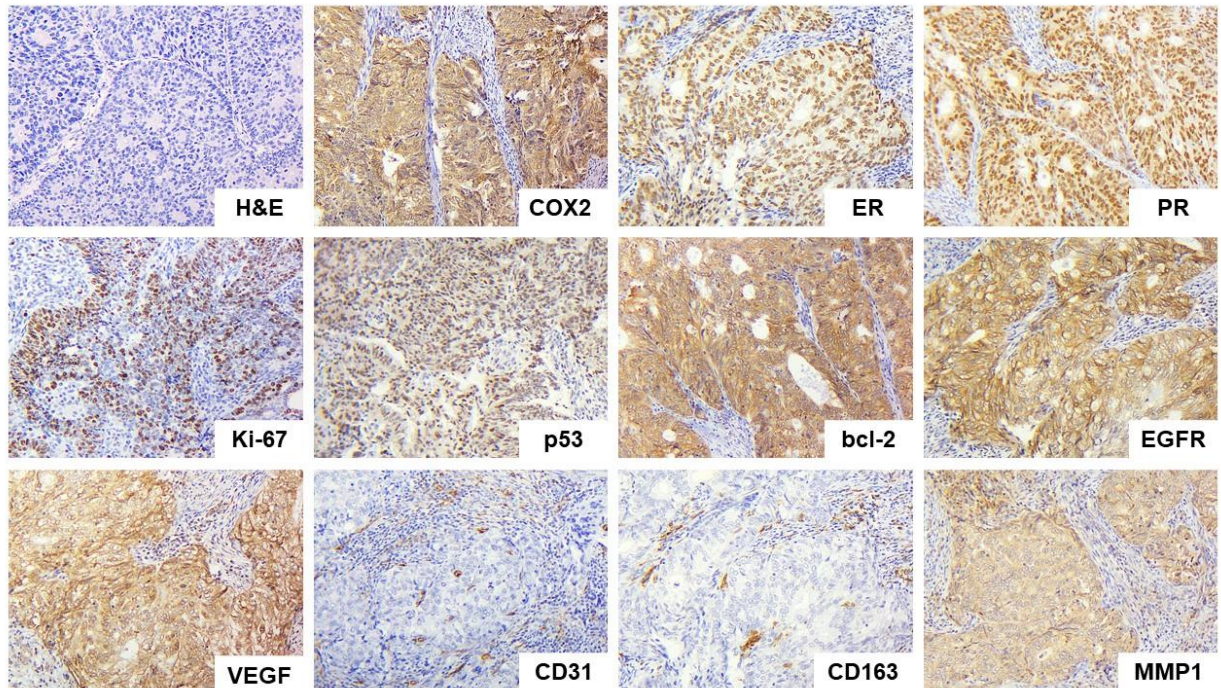


Рисунок 1.3 – Ендометріюїдна карцинома ендометрію, ступінь 3. Фарбування гематоксилином та еозином (H&E). Тканини ЕАЕ з експресією ЦОГ2, ER, PR, Ki-67, p53, bcl-2, EGFR, VEGF, CD31, CD163 і MMP1, виявлені за допомогою імуногістохімії. Збільшення x200.

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

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

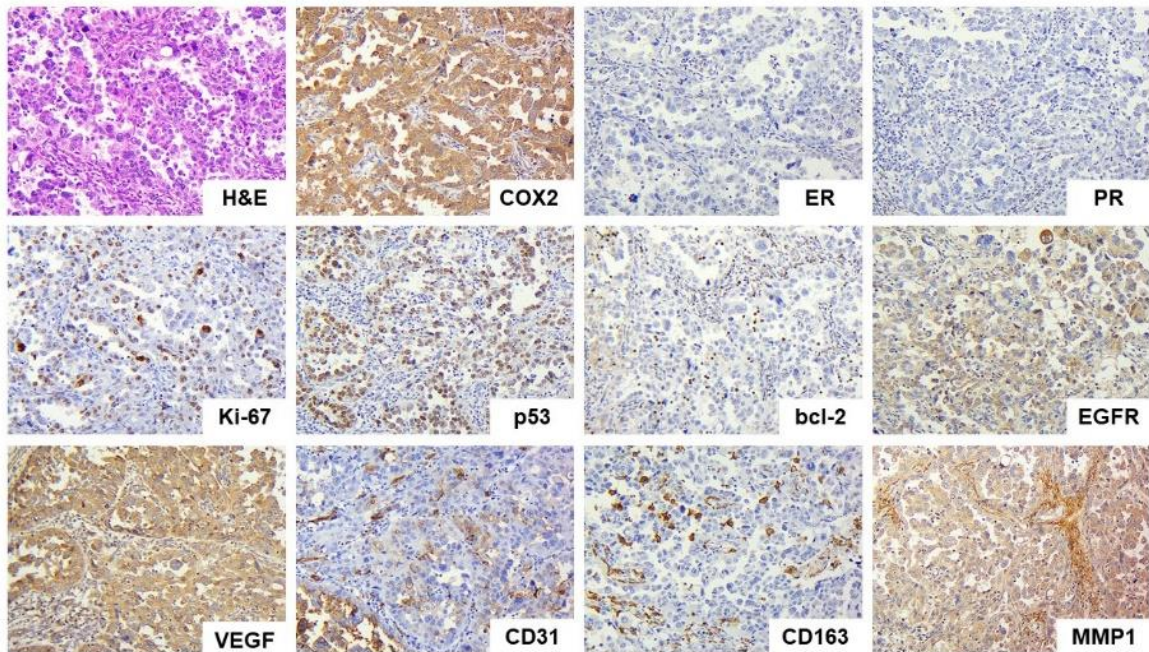


Рисунок 1.4 – Серозна карцинома ендометрію. Фарбування гематоксиліном та еозином (H&E). Тканини ЕАЕ з експресією ЦОГ2, ER, PR, Ki-67, p53, bcl-2, EGFR, VEGF, CD31, CD163 і MMP1, виявлені за допомогою імуногістохімії. Збільшення x200.

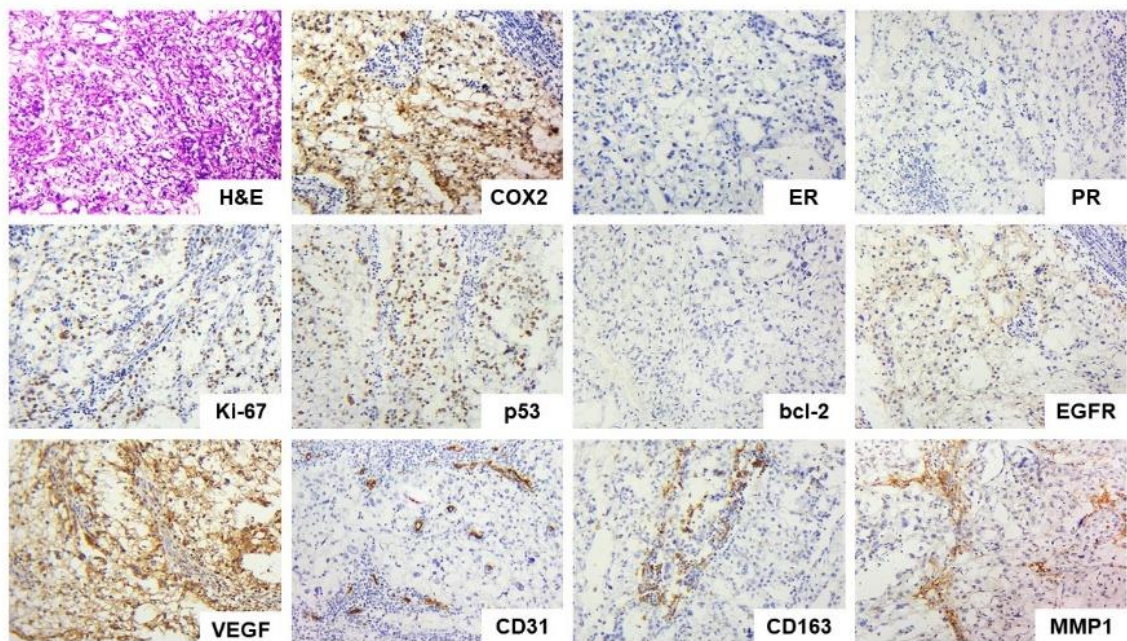


Рисунок 1.5 – Світло-клітинна карцинома ендометрію. Фарбування гематоксиліном та еозином (H&E). Тканини ЕАЕ з експресією ЦОГ2, ER, PR, Ki-67, p53, bcl-2, EGFR, VEGF, CD31, CD163 і MMP1, виявлені за допомогою імуногістохімії. Збільшення x200.

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

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

Результати імуногістохімічного дослідження пухлинних клітин

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

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

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

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

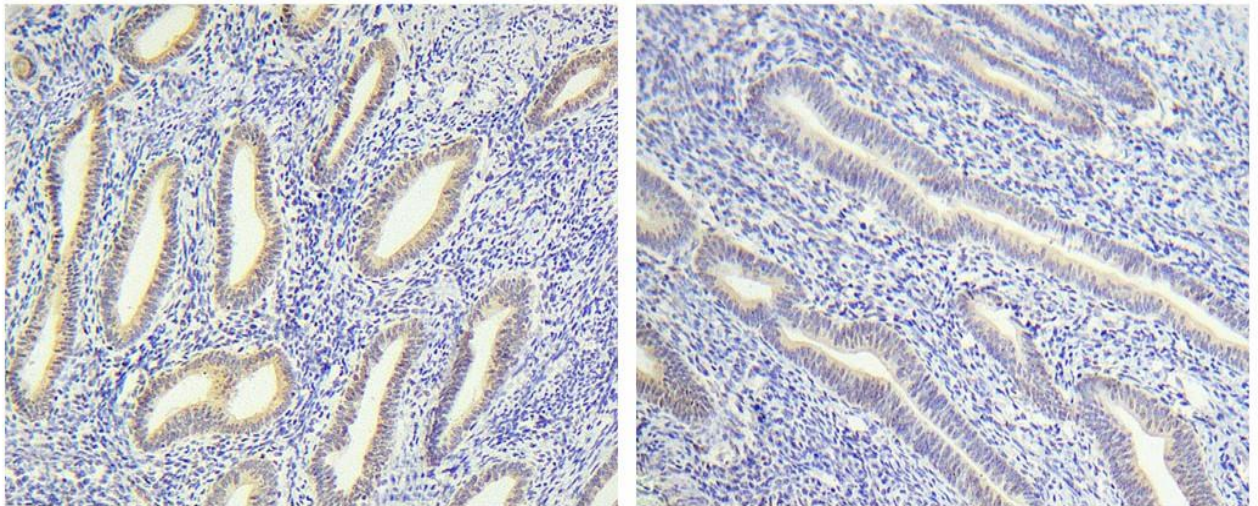


Рисунок 1.6 – Нормальний ендометрій з експресією ЦОГ2, виявлений за допомогою імуногістохімії. Збільшення x200.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

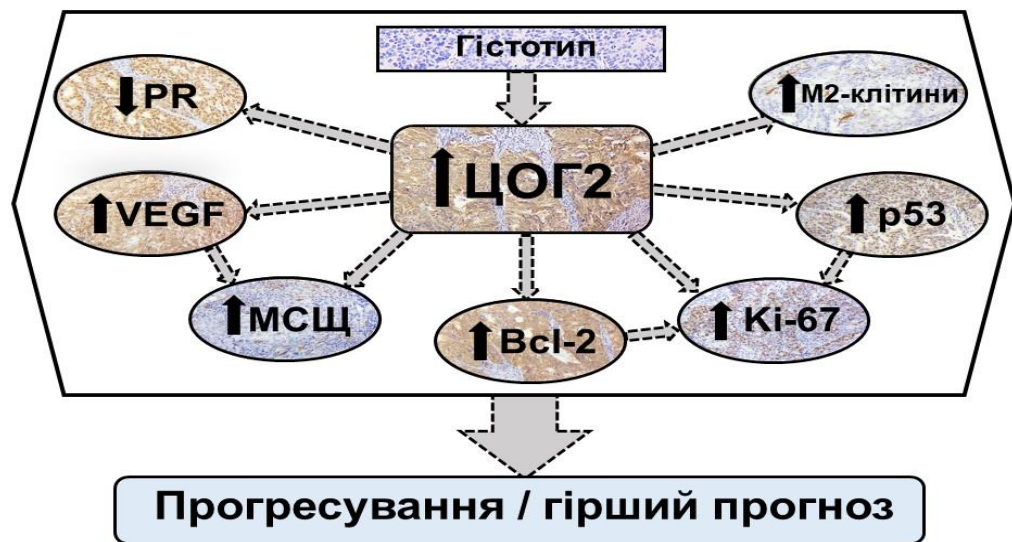


Рисунок 8. Схема впливу зростання ЦОГ2 на фенотип АЕ: При дедиференціюванні ЕАЕ та у САЕ/СКАЕ спостерігається надекспресія ЦОГ2. Це призводить до пригнічення експресії PR, посилення експресії VEGF, Bcl-2, р53, зростання проліферативної активності клітин, МСЦ та інфільтрації М2-макрофагами. Все вищезазначене призводить до прогресування АЕ та погіршення прогнозу.

Зростання кількості ЦОГ2 у клітинах АЕ призводить до гіршого прогнозу. Наявність низки селективних блокаторів ЦОГ2 та попередні дані про їх ефективність при деяких карциномах [8, 40, 41] виглядає ефективним доповненням у лікуванні АЕ.

2 ЗАЛЕЖНІСТЬ МІКРОСУДИННОЇ ЩІЛЬНОСТІ КАРЦИНОМ ТІЛА МАТКИ ВІД ГІСТОЛОГІЧНИХ ТА ІМУНОГІСТОХІМІЧНИХ ОСОБЛИВОСТЕЙ ПУХЛИН

Найбільш частими злоякісними пухлинами тіла матки є ендометріодні аденокарциноми (ЕА), які складають близько 70-80% серед усіх ендометріальних карцином [1]. Вони відносяться до Типу I карцином ендометрію і переважно є чутливі до гормональної терапії [2]. Залежно від площі, зайнятої солідним пухлинним ростом, ЕА поділяються на високо- (ступінь 1), помірно- (ступінь 2) та низко-диференційовані (ступінь 3). Слід зазначити, що при вираженому клітинному плеоморфізмі ступінь може збільшуватись на одну позицію, незважаючи на площу солідного росту [3]. Серед доведених прогностичних маркерів найбільше значення мають стадія захворювання, вік, гістологічний grade, а також ступінь експресії рецепторів до естрогену (ЕР) та прогестерону (ПР), Ki-67 та p53 [2].

На перебіг злоякісних пухлин можуть впливати не тільки якісні характеристики неопластичних клітин, але й їх строми. Протягом останніх десятиріччів все більше уваги приділяється неоваскуляризації тканини ЕА та її впливу на прогресування пухлин [4-12]. Об'єктивним показником цього процесу є рівень мікросудинної щільності (МСЩ), який у ЕА значно перевищує показники непухлинної тканини [7,9,10]. Виявлено вплив МСЩ на загальну виживаність [5,7,8], наявність лімфоваскулярної інвазії [4,7,8], інвазії міометрію [8] та метастазування пухлин [7,8]. Вищі показники МСЩ спостерігалися у менш диференційованих ЕА (ступінь 2 та 3) [4,6,9]. Експресія рецепторів пухлинними клітинами також відображалася на неоваскуляризації тканини ЕА [4,5,6]: спостерігається зростання МСЩ при надекспресії фактору росту ендотелію судин (VEGF) [5,6,12], індукований гіпоксією фактор 1 α і транспортер глюкози-1 [12]; а також у ЕР та ПР негативні пухлини [4]. При карциносаркомах ендометрію епітеліальний компонент має вищу МСЩ ніж стромальний [11].

Метою нашого дослідження стало встановлення залежності МСЦ у тканині ЕА від гістологічних особливостей пухлинної тканини, експресіями пухлинними клітинами ER, PR, Ki-67, p53, E-кадгерину та VEGF, а також її вплив на метастатичний потенціал карцином. З одного боку, прогресування карцином органів репродуктивної системи (їх дедиференціювання та метастатичне поширення) супроводжуються пригніченням експресії ER, PR та E-кадгерину [13,14]. З іншого боку, зростання grade призводить до посилення експресії Ki-67, p53 та VEGF у цих пухлинах [13-15]. Дані ж про комбінований їх вплив на МСЦ ЕА є лімітованими.

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

З парафінованих блоків з зразками ми виготовляли зрізи завтовшки 4×10^{-6} м та наносили їх на адгезивні скельця ("Thermo Scientific", США), які підлягали стандартній депарафінізації в двох порціях ксилолу і регідратації в низхідних концентраціях етанолу. Демаскування антигенів проводилося термічною обробкою препаратів у водяній бані "ВБ-4" (Україна) при температурі 98°C у цитратному буфері (pH 6,0). Візуалізацію рецепторів ми проводили за допомогою системи детекції "UltraVision Quanto Detection System HRP DAB Chromogen" ("Thermo scientific", США), яка включає блокування ендогенної пероксидазної активності перекисем водню (10 хв), кон'югація з первинними антитілами (30 хв), блокування неспецифічного фонового забарвлення з використанням "Ultra V block" (5 хв) та посилення реакції за допомогою "Primary Antibody Amplifier Quanto" (10 хв). Між усіма етапами використовували трис-буфер (pH 7,3) для промивання препаратів. Кінцева візуалізація проводилася діамінобензидином (ДАБ) під контролем

мікроскопу (патерни експресії мали коричневий колір). Реакція зупинялася зануренням скелець в дистильовану воду. Візуалізація клітин проводилася гематоксиліном Маса. При імуногістохімічному дослідженні ми використовували кролячі моноклональні антитіла до EP (клон SP1), PP (клон YR85), Ki-67 (клон SP6) та E-кадгерину (клон 67A4) (“Thermo Scientific”); мишачі моноклональні антитіла до p53 (клон SP5) (“Thermo Scientific”); кролячі поліклональні антитіла до VEGF (“Thermo Scientific”); мишачі моноклональні антитіла до CD31 (клон 1A10) (“Bio-Rad”).

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

Таблиця 2.1 – Характеристика груп пацієнтів за стадією по FIGO. Наявність достовірної різниці між групами пацієнтів згідно ANOVA

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

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

При дослідженні гістологічних зразків ми встановили, що 7 з них відповідали ступеню 1, 16 – ступеню 2 та 7 – ступеню 3. Рівень

диференціювання ЕА залежав від площі пухлини із солідними патернами та ступеню ядерної атипії: G1 – менше 5% солідних полів та незначна атипія ядер, G2 – солідні поля займали від 6 до 50% з помірною ядерною атипією та G3 – більше 50% площі зайнято солідними полями пухлин, спостерігається виражена ядерна атипія (рис. 2.1).

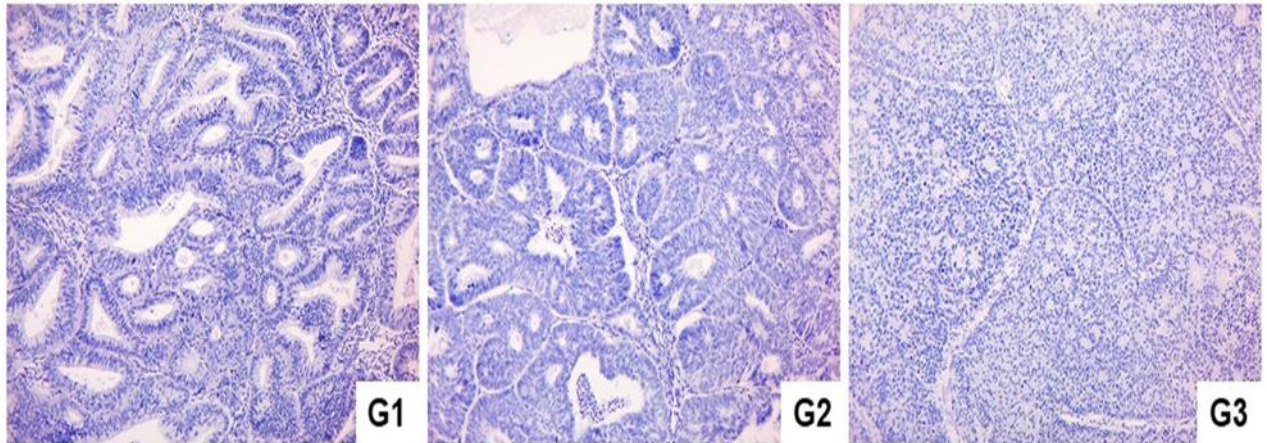


Рисунок 2.1 – Зразки ЕА різного гістологічного ступеню. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення x100.

У той же час ми знайшли відмінності між різними гістологічними ступенями ЕА (табл. 2.2).

Таблиця 2.2 – Характеристика груп пацієнтів за ступенем пухлини. Наявність достовірної різниці між групами пацієнтів згідно ANOVA.

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

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

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

При імуногістохімічному дослідженні встановлено, що експресія Е-кадгерину у 6.7% випадків тканини ЕА була слабкою, у 43.3% – помірною та у 50.0% – сильною. Слабка експресія VEGF спостерігалась у 23.3%, помірна – у 36.7% та сильна – у 40.0%. Тканина ЕА мала дифузну гранулярну локалізацію VEGF у цитоплазмі пухлинних клітин зі збереженням тенденції до перинуклеарної апікальної локалізації у високо-диференційованих пухлинах. Стромальні лейкоцити та ендотелій судин слугували активним внутрішнім контролем якості імуногістохімічного дослідження. Експресії ER, ПР та Ki-67 виявлено у всіх зразках пухлини, яка у середньому складала $58.8\pm 12.7\%$, $42.4\pm 12.2\%$ та $45.8\pm 16.1\%$ відповідно. Наявність експресії p53 виявлено лише у 16.7% випадків. Приклади позитивної експресії вищевказаних білків зображено на рисунку 2.2.

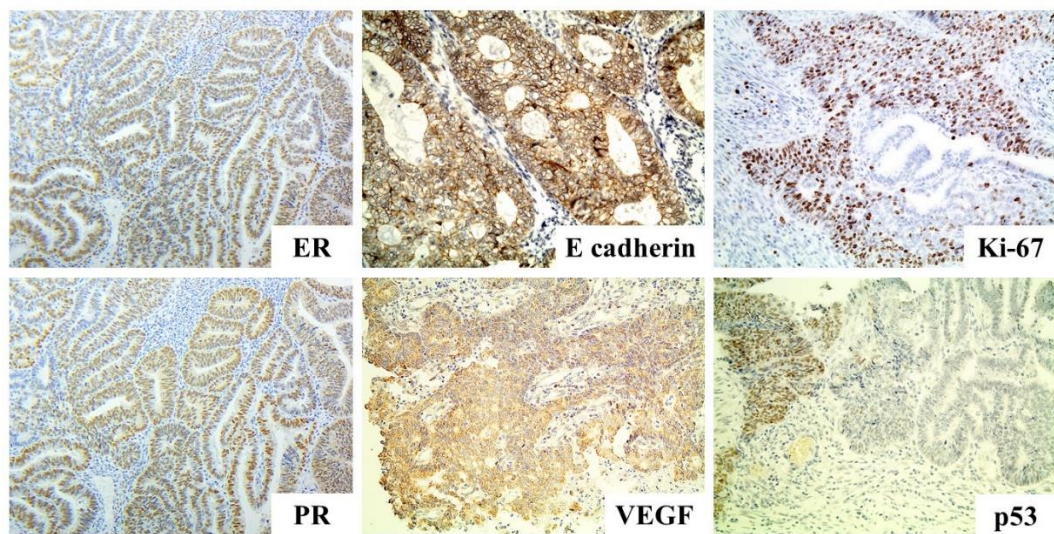


Рисунок 2.2 – Тканина ЕА з експресіями ER, ПР, Е-кадгерину, VEGF, Ki-67 та p53, виявлені при імуногістохімічному дослідженні. Збільшення x200.

При імуногістохімічному дослідженні експресії CD31 виявлено, що тканина ЕА має різний ступінь неоваскуляризації (рис. 2.3). В одному полі зору мікроскопу при збільшенні $\times 200$ ми виявляли від 5 до 37 судин. У середньому МСЦ складала 19.2 ± 7.5 . Як зазначалося раніше, більш агресивні (G2 та G3) ($F=6.34$, $p=0.0055$) та розповсюджені (стадія 2 та 3) ($F=10.33$, $p=0.0005$) пухлини мали вищу МСЦ, яка не залежала від віку пацієнтів ($r=-0.002$, $p=0.99$).

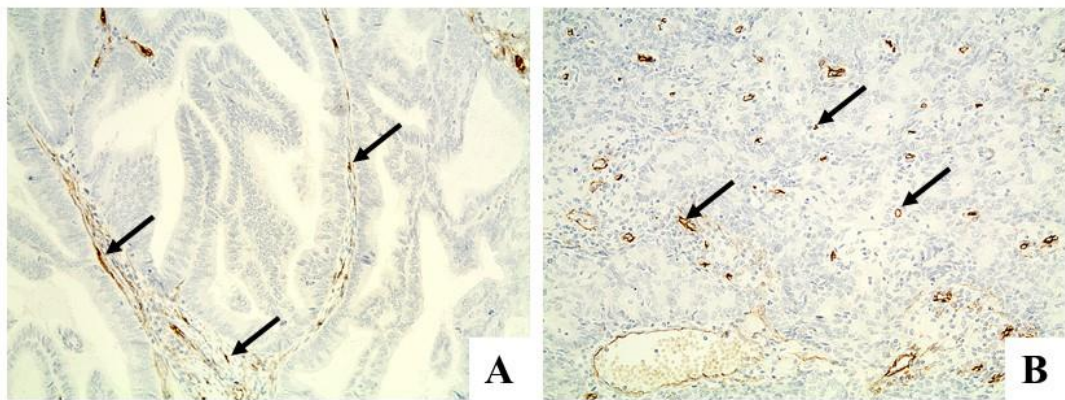


Рисунок 2.3 – Тканина ЕА з експресією CD31. Тут представлені зразки ЕА з незначною та вираженою васкуляризацією (судини показують позитивний ДАБ-сигнал та помічені стрілкою). Збільшення $\times 200$.

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

Окрім цього ми виявили, що МСЦ залежала не тільки від морфологічних характеристик карцином (їх ступеню), але і від рецепторного профілю неопластичних клітин (рис. 2.4). Вищі показники МСЦ спостерігалися при зниженні експресії Е-кадгерину ($F=4.56$, $p=0.0197$) та

надекспресії VEGF ($F=4.38$, $p=0.0225$). Одночасно, ми спостерігали посилення МСЦ при пригніченні експресії ПР ($r=-0.5$, $p=0.005$) та посиленні проліферативної активності клітин ($r=0.5$, $p=0.0047$). Важливо відмітити, що випадки з метастатичним поширенням карциноми у лімфатичні вузли також мали значно більшу МСЦ ($u=20.5$, $p=0.0003$) порівняно з неметастатичними карциномами. При цьому також слід зазначити, що серед інших гістологічних та імуногістохімічних характеристик ЕА тільки експресія ПР мала вплив на їх метастатичний потенціал – ЕА з наявністю метастазів у лімфатичні вузли мали менші рівні експресії ПР ($u=43.0$, $p=0.0086$).

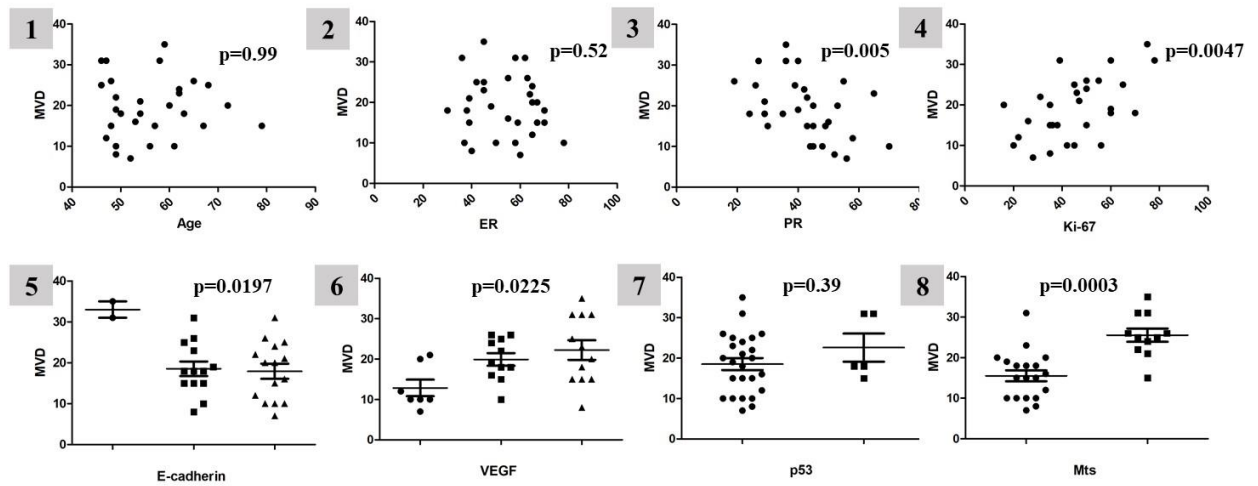


Рисунок 2.4 – Дослідження залежності між МСЦ та віком пацієнтів, експресіями ER, ПР, Ki-67, Е-кадгерину, VEGF, p53 та її впливу на метастазування ЕА. На наявність статистичної достовірності вказує $p < 0.05$. 1-4 – аналіз коефіцієнта кореляції Спірмена, 5-6 – дисперсійний аналіз, 7-8 – аналіз Манна-Уїтні.

Злоякісні пухлини тіла матки хоча і займають 15-е місце у структурі онкологічної захворюваності у світі (2.2%), проте вони є частою причиною смерті у жінок [16]. Найбільш поширеним їх варіантом є ЕА [1]. Прогноз перебігу ЕА залежить від багатьох факторів, серед яких стадія захворювання та гістологічний ступінь мають домінуючий вплив [2]. Крім того, на сьогоднішній день доведеним є вплив рецепторного профілю пухлинних

клітин та пухлинного мікрооточення на прогресування карцином [2,13-15,17,18]. При цьому особливості стромального компоненту пухлин також впливають на перебіг та метастазування злоякісних пухлин [4,5,7,8,19]. МСЦ, як один з ключових індикаторів метастатичного потенціалу карцином, залежить від низки гістологічних та імуногістохімічних особливостей пухлин [5,6,12].

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

Натомість, посилення МСЦ при надекспресії VEGF є проявом функціональної активності цих білків, які при вивільненні з неопластичних клітин стимулюють утворення нових судин у пухлині та навколо неї, стимулюючи проліферацію та міграцію ендотеліальних клітин, а також деградацію позаклітинного матриксу [20]. Результатом цього, з одного боку, є зростання забезпечення тканини карцином киснем та необхідними речовинами, стимулюючи пухлини до збільшення. З іншого боку, новоутворені судини мають підвищену проникність стінки, яка стає вхідними воротами для пухлинних клітин і їх лімфогенного та гематогенного метастазування. Саме це ми показали у нашій роботі – посилення МСЦ супроводжувалося більш частим метастазуванням ЕА у лімфатичні вузли. Схема взаємозв'язку між прогресуванням пухлин, посиленням МСЦ та метастазуванням карцином зображена на рисунку 2.5. Наші результати також

підтвердили раніше опубліковані дані про вплив ступеню ЕА на експресію прогностично важливих білків [21,22]. Дедиференціювання карцином супроводжувалося пригніченням експресії Е-кадгерину, ЕР та ПР. При цьому спостерігалось посиленням експресії VEGF, p53 та Ki-67. Крім того, ми виявили позитивну кореляцію між експресією ЕР та ПР; негативні кореляції між експресією ЕР та Ki-67, ПР та Ki-67. Це свідчить про синхронність виникнення морфологічної та імунологічної анаплазії при прогресуванні ЕА та можливості прогнозування перебігу захворювання, використовуючи дані гістологічного та імуногістохімічного дослідження біопсійного матеріалу.

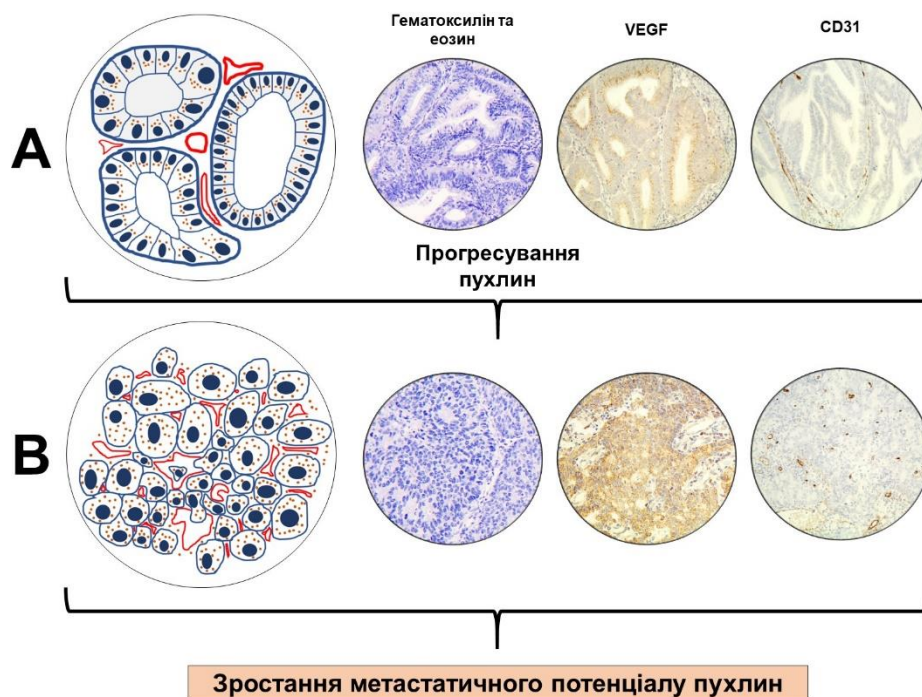


Рисунок 2.5 – Схема зростання МСЩ у тканині ЕА при прогресуванні карцином (зміні ступеню) та варіабельності рецепторного профілю пухлинних клітин. А: Низький рівень МСЩ у низького ступеню злоякісності ЕА. Пухлинні клітини з переважно перинуклеарним (на апікальній стороні) розташуванням VEGF (на схемі позначено рожевим кольором). Низька ймовірність потрапляння VEGF у екстрацелюлярні тканини. В: Високий рівень МСЩ у високого ступеню злоякісності ЕА. Пухлинні клітини з дифузним розташуванням VEGF. Легка можливість потрапляння VEGF у екстрацелюлярні тканини зі стимуляцією ангіогенезу.

Різницю в експресії рецепторів у тканині ЕА між різними стадіями по FIGO ми виявили лише для ПР. ЕА з наявністю метастазів у лімфатичні вузли

мали також менші рівні експресії ПР. На нашу думку, саме наявність та рівень експресії ПР є більш прогностично важливим індикатором. Про це повідомлялося і раніше, але дослідження стосувалися раку молочної залози, а не ЕА [22-24].

З ОСОБЛИВОСТІ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЇ ВІЗУАЛІЗАЦІЇ ЗЛОЯКІСНИХ ПУХЛИН

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

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

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

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

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

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

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

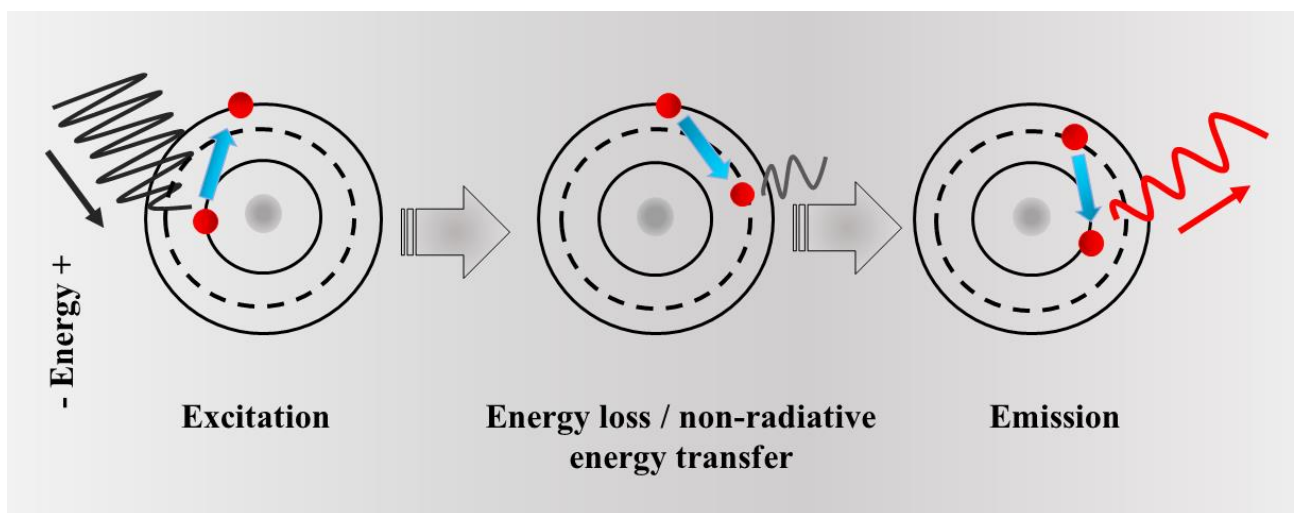


Рисунок 3.1 – Схематичний рисунок, що демонструє принцип флуоресценції.

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

інфрачервоного

діапазону.

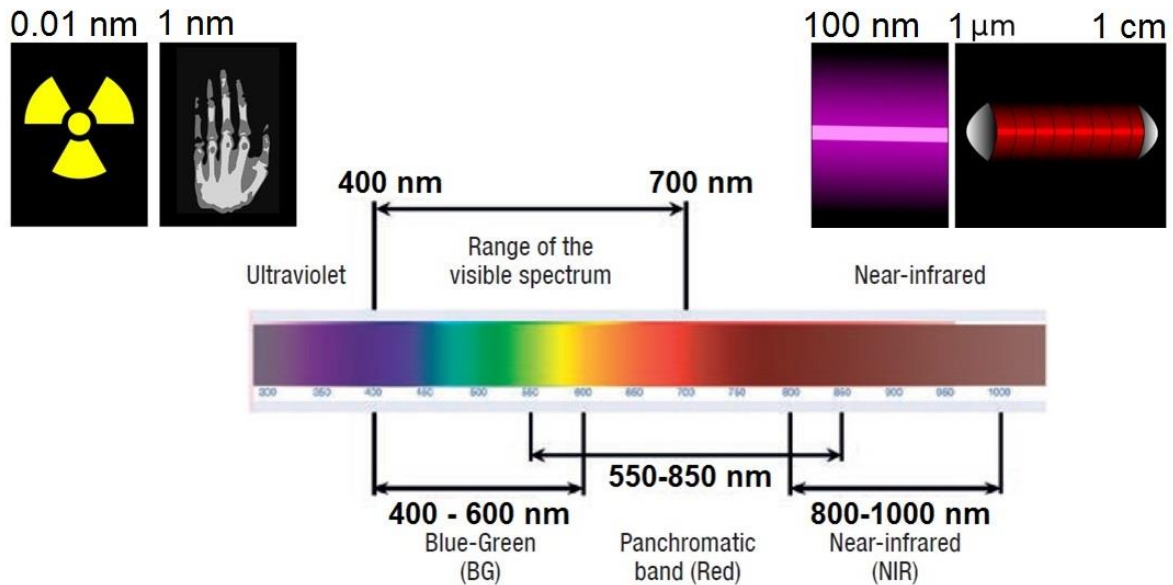


Рисунок 3.2 – Електромагнітний спектр з докладним описом видимого та інфрачервоного діапазону

Хоча у літературі описані випадки комбінування антитіл мічених як радіонуклідом, так і флуорофором [12]. Оскільки наш огляд зосереджений на неіонізуючій навігації, ми хотіли б коротко ознайомити читача з досягненнями в оптимізації мічених антитіл радіонуклідом (т.зв. радіоактивною міткою) та подвійною міткою. Подвійне маркування пухлинного ураження дозволяє отримати високе співвідношення сигналу пухлина/фон [13]. Хоча чутливість є відносно високою (в діапазоні від 10^{-9} до 10^{-12} М), дози флуоресцентних агентів, необхідні для візуалізації, значно більші, ніж ті, що використовуються для ядерної візуалізації.

3.1 Інтеропераційна візуалізація новоутворень комбінацією радіоактивної мітки та флуоресцентного сигналу

Для картування сторожових лімфатичних вузлів може бути достатньо перитуморальної ін'єкції барвників радіоізотопів або наноколоїдів у разі дисекції лімфатичних вузлів [14,15]. Однак для оцінки меж пухлини антитіла здаються особливо підходящими, оскільки вони специфічно накопичуються в

пухлинній тканині і можуть бути кон'юговані з сигнальними молекулами, що представляють інтерес. Автори [16] використовували гамма-зонд для реєстрації антитіла, пов'язаних з різними радіонуклідами. Однак радіологія за допомогою гамма-зонда не забезпечує точного визначення меж пухлини та країв резекції. Подвійна мітка з флуоресцентною візуалізацією дозволяє подолати обмеження двох окремих методів, проте варто пам'ятати, що глибина проникнення світла, що випромінюється, в біологічні тканини обмежена кількома міліметрами [17]. Тому авторами було виконано синтез антитіл з подвійною міткою: кон'югація флуорофору з антитілами. Для цих цілей використовували IRDye 800CW-NHS та ^{111}In був придбаний у Mallinckrodt (Petten, Нідерланди). Естер 800CW NHS (еквівалент IRDye 800CW NHS) — це флуоресцентний барвник із високою водорозчинною здатністю в ближньому інфрачервоному діапазоні, його можна безпосередньо позначити на біомолекулах, таких як первинне антитіло, вторинне антитіло тощо. Співвідношення заміни барвника на антитіло визначалося за допомогою вимірювання абсорбції при 280 і 774 нм з 3% корекцією через поглинання IRDye 800CW при 280 нм (згідно з протоколом виробника) за допомогою спектрофотометра Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech, Amersham, UK). Флуоресцентні зображення тварин отримували на довжині хвилі збудження 745 нм, використовувався набір індоціанінових зелених фільтрів (810-885 нм). Лабораторних мишей сканували протягом 1-5 хвилин. На рис. 3.3 показані зображення SPECT/CT мишей із пухлиною SK-RC-52 на правому боці після ін'єкції подвійно міченого гірентуксимабу. З рисунка ми бачимо важливість відношення барвника до антитіла для антитіл з подвійною міткою, що визначає візуалізацію меж *in vivo* [18]. При співвідношенні 2 або вище, накопичення антитіл з подвійною міткою в печінці збільшується, тоді як поглинання пухлиною знижується.

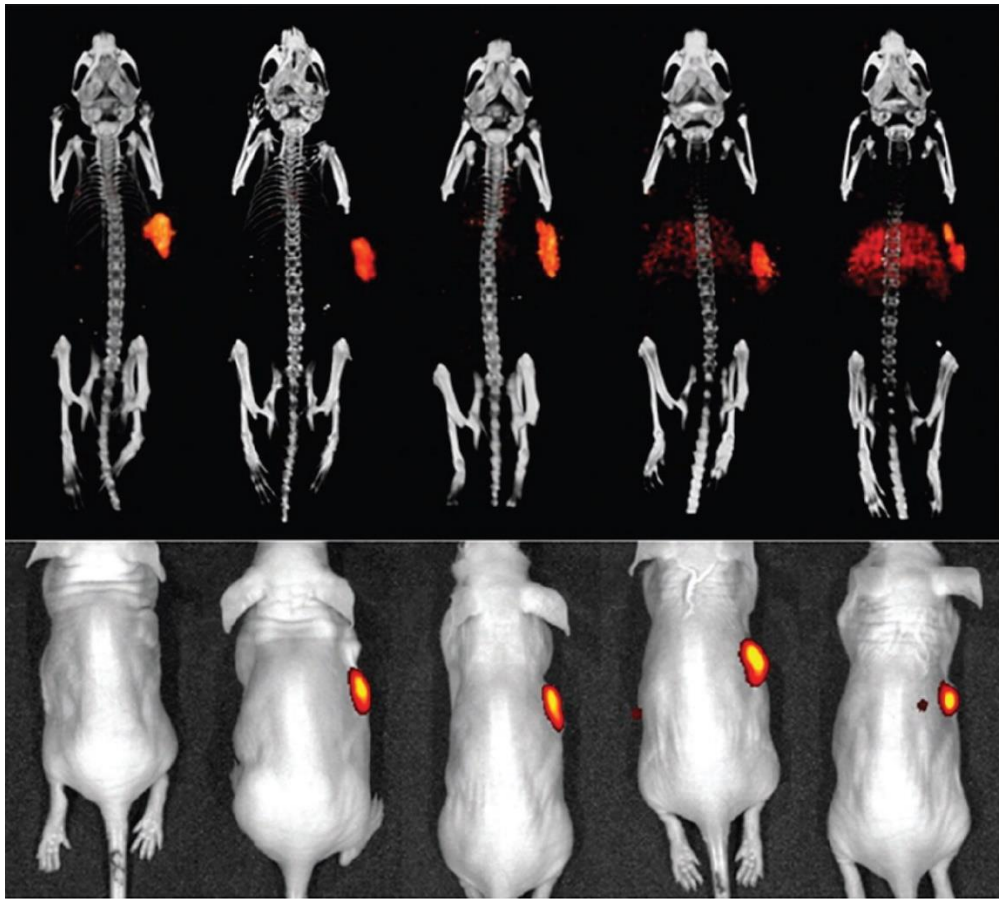


Рисунок 3.3 – SPECT - зображення (вгорі) та флуоресцентні зображення (внизу) мишей із пухлинами SK-RC-52 на правому боці через 48 годин після ін'єкції ^{111}In -DTPA-girentuximab-IRdye 800CW із співвідношенням заміни барвника до антитіла 0,1 , 1,5, 2 і 3 (зліва направо) [18].

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

3.2 Клінічно доступні методи флуоресцентної візуалізації

В даний час більшість зображень для інтєраопераційної навігації отримані за допомогою системи Novadaq SPY (схвалено FDA в 2005 році). Novadaq Spy

здатна відобразити флуоресцентну контрастну речовину, що випромінює світло з довжиною хвилі 830 нм при проходженні через судинне русло або камери міокарда. Проходження контрастної речовини можна спостерігати в реальному часі. Ринок систем флуоресцентної онкологічної хірургії розширюється з кожним роком. На рис. 3.4 показано кілька нових систем флуоресцентної візуалізації схвалених FDA, а також добірка робочих параметрів.

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

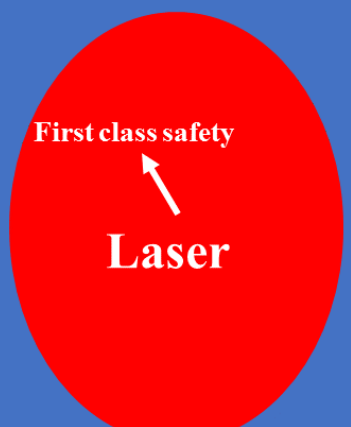
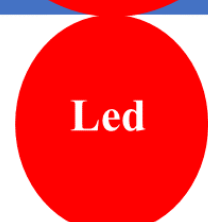
Imaging system	Excitation wavelength(s) nm	Light Source
NOVADAQ SPY (Novadaq technologies)	850	
FLUOBEAM (Fluoptics Company)	750 (800)	
FLUOBEAM SYSTEMS (Fluoptics Minatec)	680 (750)	
QUEST SPECTRUM (QUEST Medical Imaging)	400 – 1,000	
VS3 Iridium system (VisionSense)	805 (emission band 825 - 850)	
LIGHTVISION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

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

The VS3 – Visionsense Stereoscopic High Definition (3DHD) Vision System усуває обмеження традиційних ендоскопічних систем, надаючи лікареві здатність точно оцінювати глибину, об'єм чи відстань. У порівнянні з

традиційними ендоскопічними процесами VS3 система включає в себе підтримку для Infrared (IR) Fluorescence visualization. Система VS3 знаходиться на висоті від 20 до 40 см над пацієнтом під час хірургічної процедури. Модулі VS3 Iridium призначені для роботи з ІЧ-флуоресцентними барвниками: індоціаніновим зеленим або ICG. Збудливе випромінювання спрямоване на хірургічне поле для збудження молекул барвника і надалі уловлюється за допомогою ІЧ-камери [20]. Система дозволяє захоплювати зображення у білому світлі паралельно з флуоресцентним ІЧ-зображенням та відображати обидва зображення для хірурга, щоб забезпечити кращу картинку для хірурга.

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

лімфосцинтиграфії та інтраопераційного гамма-зондування, тоді як два радіоактивні вузли були визнані негативними за допомогою методу барвника. І навпаки, всі радіоактивні вузли показали флуоресценцію ICG. Один ICG-флуоресцентний SLN був негативним на основі методу фарбування та не показав радіоактивності (аксиллярний вузол).

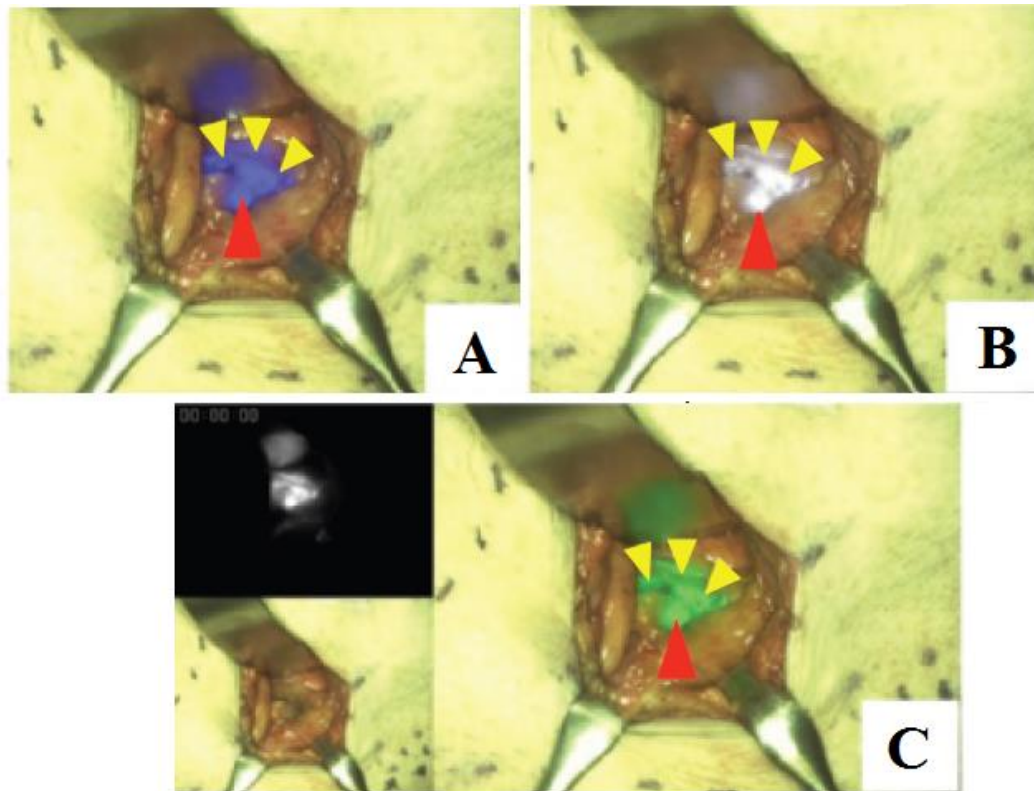


Рисунок 3.5 – Інтраопераційне використання LIGHTVISION для виявлення дозорних вузлів. С) Флуоресцентне зображення в ближньому інфрачервоному діапазоні, видиме зображення та флуоресцентне зображення у видимому + інфрачервоному діапазоні (права панель); червона стрілка: флуоресцентна зовнішня клубова SLN;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

ICG зв'язується з альбуміном і генерує пікову довжину хвилі 840 нм NIR флуоресценції при збудженні світлом 765 нм. Використовуючи NIR-камеру під час операції, ICG, введений навколо первинної пухлини, можна

спостерігати в підшкірному лімфатичному потоці та SLN на флуоресцентному зображенні. Метод ICG особливо корисний, коли SLN не можна виявити за допомогою методу барвника.

Перемикаючи колір флуоресцентного зображення, хірурги можуть легко відрізнити лімфатичні судини та вузли навколишніх тканин. Автори повідомляють, що на білому зображенні легше ідентифікувати лімфатичні підшкірні шляхи від вищележачої шкіри в порівнянні з іншими підсвічуваннями. Зображення зеленого кольору забезпечувало кращу візуалізацію розрізнення лімфатичних судин і SLNs від навколишньої жирової тканини. LIGHTVISION має кілька обмежень викликаних великим розміром основного блоку і гнучкістю його camera arm.

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

FLUOBEAM від компанії FLUOPTICS - це ще одне інтегроване рішення для флуоресцентної візуалізації, представлене на ринку, яке надає хірургу під час операції додаткову інформацію, таку як перфузія тканин, ефективність лімфодренажу, а також розташування лімфатичних вузлів та парашитовидних залоз. Як і інші подібні системи, FLUOBEAM використовує систему оптичної візуалізації ближнього інфрачервоного діапазону (NIR), однак його оптична головка оснащена лазером класу 1 як джерело збудливого світла з чутливою

до ближньої інфрачервоної області камерою. Це дозволяє виявляти флуоресцентні маркери вглиб на кілька міліметрів у біологічну тканину. Лазери класу 1 вважаються нешкідливими для очей навіть за прямої дії. Для видимого світла потужність вихідного променя до 0.39 мВ, відноситься до класу безпечних для "довготривалого" візуального контакту. Під терміном "довготривалий" візуальний контакт розуміється час більше $\frac{1}{4}$ сек. У свою чергу клас 1 поділяється на два підкласи: 1 та 1М. Лазери класу 1М не можуть використовуватися спільно з оптичними інструментами, такими як бінокляр або збільшує скло. У документах, представлених виробником FLUOBEAM, не вказано точний тип лазера і виведення в підклас не описано.

3.3 Широкозастосовні та доступні для клінічного використання флуоресцентні візуалізаційні зонди

Індоціанін зелений (ICG)

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

містять йод, про протипоказання, застереження, запобіжні заходи та побічні реакції, пов'язані із застосуванням препарату.

Зображення отримують з використанням джерел відфільтрованого світла та високочутливих камер із зарядовим зв'язком (ПЗЗ), які можуть виявляти пікомолярні та фемтомолярні концентрації зонда з тимчасовою роздільною здатністю від секунд до хвилин.

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

Метиленовий синій (МВ)

Метиленовий синій (МВ) є гідрофобною молекулою ліків, яка має важливе значення як реагент для фарбування, так і як фармацевтичний агент. МВ є сильно флуоресцентним, з піком випромінювання при 686 нм (лех 665 нм) і додатковим піком при 293 нм. З'єднання метилену синього має молекулярну масу 320 Так [36]. Це схвалений FDA видимий (темно-синій) контрастний агент. При достатньому розведенні МВ діє як флуоресцентний барвник ближнього інфрачервоного діапазону, який працює в оптичному вікні NIR з піком поглинання при 670 нм і виводиться природним із сечею. Федеральне управління з лікарських засобів (FDA) і Європейське агентство з лікарських засобів (EMA) схвалили клінічне використання флуорофорів індоціанінового зеленого (ICG), метиленового синього (МВ) і 5-амінолевулінової кислоти (5-ALA).

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

Для більшого розуміння доцільності вибору метиленовий синій як флуоресцентного барвника розглянемо деякі області, в яких можна використовувати хірургічну техніку під контролем МВ NIR. До першої з таких областей можна віднести локалізацію та диссекцію паразитовидних залоз, що досі залишається серйозною проблемою під час операції. Виявлення збільшених залоз часто утруднене через варіабельність їх кількості та розташування. В даний час на ринку доступно дев'ять методів ідентифікації паразитовидних залоз, п'ять з яких цікавлять нас у контексті цього огляду, а саме: автофлуоресцентна спектроскопія, автофлуоресцентна візуалізація, ICG-візуалізація, флуоресцентна візуалізація метиленового синього, 5-ALA [39 – 43]. Метиленовий синій традиційно вводять внутрішньовенно у високій дозі (3–7,5 мг/кг), щоб неозброєним оком можна було побачити збільшені

парацитовидні залози, оскільки вони забарвлені в синій колір, але, як згадувалося раніше, ці дози пов'язані з багатьма побічними ефектами і слід застосовувати з обережністю [44,45]. Техніка NIR-флуоресценції дозволяє виявити залози за допомогою менших доз МВ. За даними Hillary et al. оптимальна доза для цієї методики становить 0,4 мг/кг, що дає змогу відрізнити парацитовидні залози від навколишньої тканини протягом прийняттого часу [46]. Найнижча доза метиленового синього, яка була введена внутрішньовенно для диференціації парацитовидних залоз від навколишньої тканини щитовидної залози, становить 0,05 мг/кг. Найбільш цікавим спостереженням з вищевикладеного матеріалу є різке зниження ін'єкційної дози метиленового синього при флуоресцентному аналізі, що є важливим аргументом на користь його використання. Одним із обмежень використання метиленового синього є потенційне порушення функції нирок, оскільки він виводиться нирками. Іншим обмеженням є обмеження використання МВ тільки для пацієнтів, здатних конвертувати МВ у нефлуоресціюючий лейкометиленовий синій, що обумовлено зниженням та/або кислотністю навколишнього середовища. Алергічні реакції на МВ частіше виникають при дозах понад 5 мг/кг, тому застосовувати метиленовий синій слід у найменшій ефективній дозі [47, 48, 49].

Ще однією областю, де застосовується метиленовий синій є лікування нейроендокринної опухолі піджелудкової залози. Метиленовий синій накопичується в нейроендокринних пухлинах при внутрішньовенному введенні, але точний механізм цієї дії невідомий [50]. При внутрішньовенному введенні МВ флуоресценція NIR від підшлункової залози залишається відносно на тому самому рівні (3.0) співвідношення сигнал/фон протягом приблизно 60 хвилин. Залежно від використання МВ можна досягти іншого співвідношення сигнал/фон. Вищий коефіцієнт досягається, коли введення МВ відбувається швидким болюсом (5–20 с), порівняно з повільною інфузією (15–20 хв). Однак обидва способи введення МВ показали контрастність у підшлунковій залозі. Можлива неповна резекція у разі підозри на множинну

ендокринну неоплазію [51]. У роботі [51] описано випадок, коли було недостатньо передопераційної діагностики методом магнітно-резонансної томографії з додатковим скануванням методом позитронно-емісійної томографії (ПЕТ). Використання візуалізації в діапазоні NIR з метиленовим синім дозволило візуалізувати нейроендокринні ураження під час операції, при цьому у всій підшлунковій залозі було виявлено більше 20 уражень не встановлених іншими методами діагностики. Це відкриття спричинило зміну підходу хірурга (рис. 3.6).

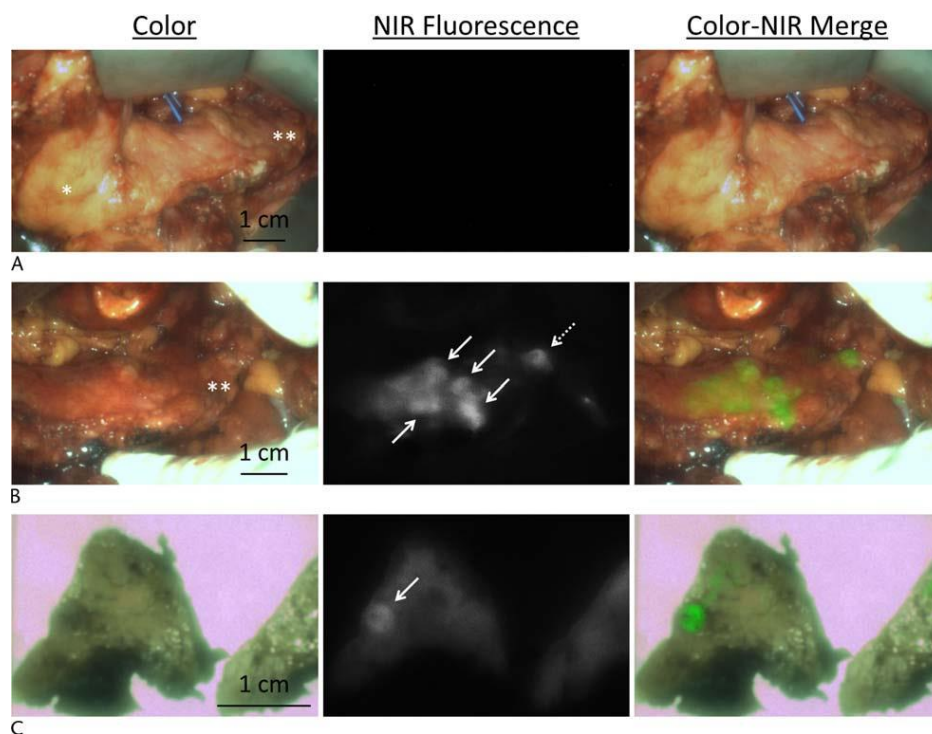


Рисунок 3.6 – Інтраопераційне та ex vivo ближнє інфрачервоне флуоресцентне зображення підшлункової залози. А - До внутрішньовенного введення МВ. В - П'ять хвилин після початку інфузії МВ. Множинні ураження в головці, тілі та хвості підшлункової залози флуоресцентні (час експозиції 50 мілісекунд). С -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

5-амінолевулінова кислота (5-ALA)

5-амінолевулінова кислота, ендогенна непротеїногенна амінокислота, є першою сполукою на шляху синтезу порфірину. Порфірини є сполученими кислотами лігандів, які зв'язують метали з утворенням комплексів. Іон металу зазвичай має заряд 2+ або 3+. Амінолевулінова кислота показана дорослим для візуалізації злоякісної тканини під час операції з приводу злоякісної гліоми (III і IV ступеня). Він використовується для візуалізації пухлинної тканини в нейрохірургічних процедурах [52]. Дослідження, проведені раніше, показали, що інтраопераційне використання цього флуорофору може зменшити залишковий обсяг пухлини та підвищити виживання без прогресування у людей із злоякісними гліомами [53, 54].

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

Чому так важливо отримати неінвазивність процедури і як це підвищує необхідність неінвазивних методів аналізу з використанням флуорофорів? Існують занепокоєння щодо впливу біопсії на саму патофізіологію пухлини, оскільки дослідження показали посилену проліферацію та міграцію

пухлинних клітин після біопсії пухлини, що включало прискорений ріст пухлини в деяких випадках [56, 57]. Це робить повторні біопсії для подальшого спостереження або дослідницьких цілей наразі не виправданими, тим більше, що захворюваність і смертність цих процедур зростає з послідовними процедурами. Сучасні методи візуалізації, як МРТ, КТ і ПЕТ-КТ, не можуть надійно відрізнити справжню прогресію опухолі від псевдопрогресії. Одним із способів задовольнити потребу у поздовжньому взятті зразків пухлини, мінімізуючи ризик для пацієнта, є рідкі біопсії [58].

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

Використовуючи вдосконалене проточне цитометричне сортування з високою роздільною здатністю, ми можемо виділити PpIX-позитивні EV з плазми пацієнтів із ГБ. За допомогою цифрової краплинної ПЛР ми можемо виявити пухлиноспецифічні мікроРНК лише в 5 відсортованих PpIX-позитивних EV. Ці дані ілюструють можливості флуоресцентної рідинної біопсії на основі позаклітинних везикул у пацієнтів з гліобластомою.

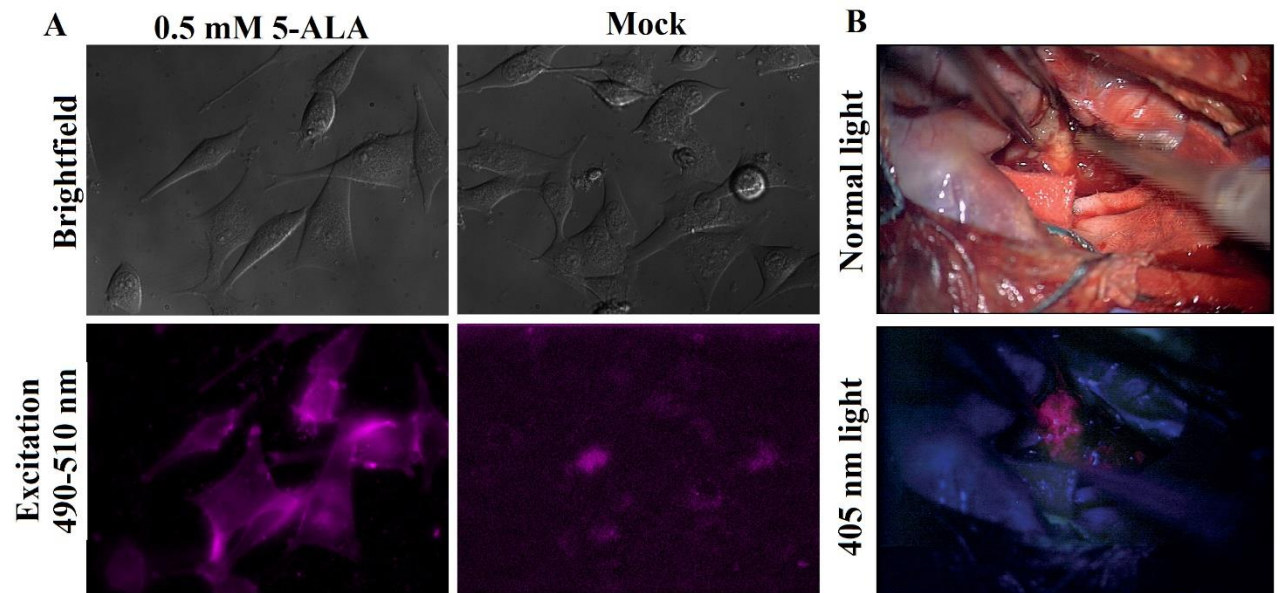


Рисунок 3.7 – (А) Клітини U87, оброблені 5-аміновуленовою кислотою (5-ALA) (ліві панелі), демонструють флуоресценцію PpIX при збудженні 490 нм випромінюванням у порівнянні з контролем (праві панелі). 40х збільшення, (В); вигляд резекції гліобластоми під час операції під білим світлом (верхній ряд) і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

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

Флуоресцеїн натрію

Флуоресцеїн натрію (NaFl) є біологічно безпечним флуоресцентним барвником, який екстравазує через порушення гематоенцефалічного бар'єру (ГЕБ) [62-64]. Цей препарат можна вводити внутрішньовенно для поліпшення візуалізації опухолевої тканини головного мозку, що базується, головним чином, на неспецифічному судинному витоку. Флуоресцеїн натрію є

натрієвою сіллю та органічним флуоресцентним барвником з піком збудження при 494 нм і піком випромінювання при 512 нм. В якості допоміжного засобу при резекції внутрішньочерепного гліому флуоресцеїн натрію застосовується з 1940-х років і він вважається безпечним. Завідома частота побічних реакцій змінюється від 1% до 6% [65]. Найбільша кількість побічних реакцій спостерігалася при пероральному застосуванні, при внутрішньовенному введенні повідомлень про побічні реакції при перерахунку на кількість випадків використання не спостерігалася. Хоча серед побічних реакцій був зафіксований випадок внезапної смерті через анафілактичний шок, його можна віднести до індивідуальної непереносимості [66]. Простий прик-тест може допомогти виявити осіб із найбільшим ризиком побічної реакції. Також спостерігається активне використання препарату в офтальмології для ангіографії сітківки із-за відносно низької вартості флуоресцеїну натрію в порівнянні з вартістю 5-ALA [67]. Флуоресцеїн натрію зазвичай видно неозброєним оком при високих дозах (20 мг/кг маси тіла) і спостерігається через жовтий фільтр 560 нм при низьких дозах, що дозволяє краще розрізнити тканини з більш природними кольорами [68, 69].

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

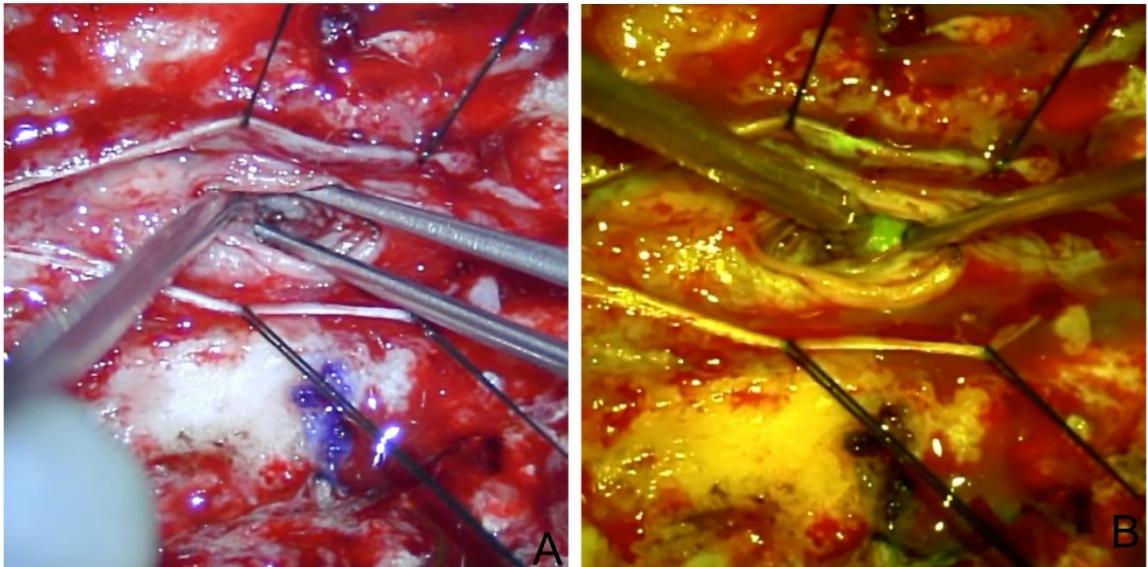


Рисунок 3.8 – Інтраопераційні мікроскопічні зображення NaFl, що демонструють ураження під час мікроскопічної дисекції та біопсії [70].

Проілюстровані в роботі [70] випадки демонструють доказ концепції того, що NaFl може бути корисним для резекції та біопсії уражень хребта, таких як гліоми високого ступеня злоякісності, пилокістозна астроцитома та епендимома. У цих пацієнтів використання флуоресцеїну натрію виявилось корисним для локалізації патологічної тканини. Остаточна патологія продемонструвала грампозитивні бактерії/інтрамедулярний абсцес, В-клітинну лімфопроліферативну хворобу, спричинену EBV, і первинне гліальне новоутворення. Лікуючому хірургу важко відрізнити аномальну тканину від паренхіми спинного мозку, і автори роботи заявляють, що Fluorescein Sodium був надзвичайно корисний при ідентифікації аномальної тканини. Fluorescein Sodium є корисним інструментом для ідентифікації області резекції та взяття зразків інтрамедулярних та внутрішніх уражень хребта, коли повна резекція небажана.

3.4 Нові зонди флуоресцентної візуалізації

Флуоресцентні барвники, які ми розглянули в попередньому розділі самі по собі зазвичай не мають пухлинної специфічності, тому виникла потреба у флуоресцентних агентах молекулярної дії. Так звані трасери складаються з

флуорофору, хімічно кон'югованого з націлюючим компонентом, останній має афінність зв'язування зі специфічною раковою молекулярною мішенню або біомаркером. Цільові трасери, бувають «завжди активними» та «активовані» та/або «розумні» зонди. Трасери, які завжди флуоресціюють, називаються «завжди активними» цільовими трасерами [71]. «Розумні» зонди не флуоресцують до тих пір, поки не активуються на мішені, пригнічуючи неспецифічні флуоресцентні сигнали і збільшуючи контраст пухлина/фон [72].

У цьому представляє інтерес робота [73]. Автори роботи використовували рекомбінантний мембранний білок *Helicobacter pylori* (НорQ), кон'югований з флуорофором IR800DyeCW для націлення на молекули клітинної адгезії, пов'язані з карциноембріональним антигеном (CEACAM), які експресують колоректальні пухлини. Слід відзначити, що представлені результати отримані тільки на дрібних тварин (мишах) і вимагають додаткових досліджень перед клінічним застосуванням. Раніше карциноембріональний антиген (CEA) був визначений як ідеальна мішень для візуалізації *in vivo*, спеціально спрямованої на колоректальні пухлини [74]. CEA, також званий CEACAM5 або CD66e, є глікофосфатидилінозитолом (GPI), закріпленим на поверхні клітини, глікопротеїном, який, як було виявлено, має надлишкову експресію в більшості випадків колоректального раку [75]. Нещодавно було показано, що *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) специфічно зв'язується через білок зовнішньої мембрани НорQ з CEACAM1, 3, 5 і 6 людини [76,77]. Взаємодія НорQ-CEACAM, здається, не залежить від кальцію, а також від рН і необхідна для транслокації онкогенного ефекторного білка SagA в клітини-господарі людини [78].

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

Ми хочемо звернути увагу читачів, в особливості біоінженерів, що займаються розробкою та вдосконаленням системи для флуоресцентної

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

Однак повернемося до результатів, отриманих у роботі [73]. Ортотопічні моделі клітинних ліній раку товстої кишки ($n=6$) були зображені через 48 годин після введення 50 мкг гНорQ-IR800. Краї пухлини були чітко визначені із середнім співвідношенням пухлини до фону (TBR)=3,678 ($SD\pm 1,027$). Ортотопічна модель клітинної лінії раку товстої кишки LS174T включала регіональні метастази діаметром приблизно 2 мм, які також чітко спостерігалися за допомогою флуоресцентної візуалізації, які в іншому випадку були невидимі (рис. 3.9). При цьому значення гНор-IR800 TBR 3,678 є кращим результатом у порівнянні з попередніми дослідженнями авторів, де SEACAM 6G5j-IR800 має TBR 3,17 [80].

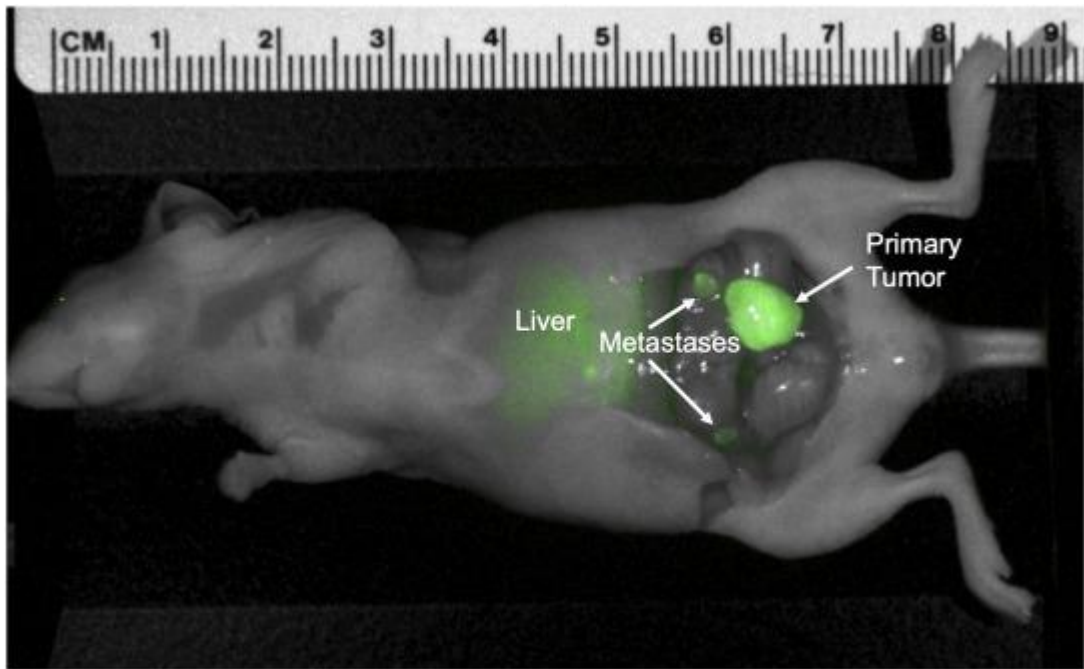


Рисунок 3.9 – Типове зображення ортотопічної моделі клітинної лінії раку товстої кишки (LS174T) через 48 годин після введення 50 мкг rHspQ-IR800 [73].

Важливо відзначити, що rHspQ зв'язується з CEACAM1 [81] навіть у поєднанні з різними флуорохромами або біотином. Тому rHspQ можна використовувати для широкого спектру застосувань, включаючи проточну цитометрію, ELISA, вестерн-блоттинг та імуногістохімічні підходи. На відміну від глікозилізованих антитіл, rHspQ є бактеріальним білком без глікозилювання, що захищає його від деградації.

Розглянуте дослідження демонструє високу афінність зв'язування rHspQ з епітеліальними раковими опухольми, надекспресивними CEAC, включаючи рак товстої кишки, шлунку та легень. Рекombінантна флуоресцентна візуалізація з підтримкою HspQ забезпечує чіткі межі первинних пухлин і метастазів у мишачих моделях раку товстої кишки PDOX і ортотопічних клітинних лініях. Це означає, що rHspQ може бути корисною альтернативою CEACAM-специфічним антитілам для передхірургічної діагностики, інтраопераційної візуалізації та хірургії під контролем флуоресценції.

ВИСНОВКИ

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

2. Прогресування ЕА супроводжується якісними та кількісними варіаціями паренхіматозного та стромального патернів пухлин. Дедиференціювання ЕА призводить до надекспресії VEGF, яка має дифузний характер у клітинах. Результатом цього є посилення МСЦ аденокарцином та посилення їх метастатичного потенціалу. Кореляційні зв'язки між гістологічними та імуногістохімічними особливостями ЕА свідчать про синхронність виникнення та прогресування морфологічної та імунологічної анаплазій, що можна використовувати при прогнозуванні перебігу захворювань.

3. Результати впровадження флуоресцентної візуалізації як допоміжного методу для виявлення раку та метастатичних уражень високого ризику в клінічній практиці продемонстрували вражаючі результати та величезний потенціал. Однак інтраопераційну флуоресцентну візуалізацію слід розглядати не як основний метод діагностики чи лікування, а як допоміжний засіб для хірурга. Таким чином, флуоресцентне дослідження не скасовує золотих стандартів діагностики доброякісних або злоякісних пухлин (традиційне обстеження, біопсія, ультразвукове дослідження та комп'ютерна томографія тощо) і зазвичай може проводитися під час інтраопераційного лікування. Крім того, оскільки флуоресцентна хірургія та методи флуоресцентної діагностики продовжують удосконалюватися, цілком імовірно, що вони еволюціонуватимуть до цільових флуоресцентних

візуалізаційних зондів, які все більше будуть націлені на певний тип ракової клітини. Найважливішим моментом залишається пошук високоселективних месенджерів флуоресцентних міток, які дають змогу ідентифікувати пухлинні клітини виключно в уражених органах і вказують хірургам межі їх поширення та метастазування.

ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ

Перелік літературних джерел до розділу 1

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

8. Hashemi Goradel N, Najafi M, Salehi E, Farhood B, Mortezaee K. Cyclooxygenase-2 in cancer: A review. *J Cell Physiol.* 2019 May;234(5):5683-5699. doi: 10.1002/jcp.27411.
9. Goswami S, Sharma-Walia N. Crosstalk between osteoprotegerin (OPG), fatty acid synthase (FASN) and, cyclooxygenase-2 (COX-2) in breast cancer: implications in carcinogenesis. *Oncotarget.* 2016 Sep 13;7(37):58953-58974. doi: 10.18632/oncotarget.9835.
10. Li F, Zhu YT. HGF-activated colonic fibroblasts mediates carcinogenesis of colonic epithelial cancer cells via PKC-cMET-ERK1/2-COX-2 signaling. *Cell Signal.* 2015 Apr;27(4):860-6. doi: 10.1016/j.cellsig.2015.01.014.
11. Obermoser V, Baecker D, Schuster C, Braun V, Kircher B, Gust R. Chlorinated cobalt alkyne complexes derived from acetylsalicylic acid as new specific antitumor agents. *Dalton Trans.* 2018 Mar 28;47(12):4341-4351. doi: 10.1039/c7dt04790h.
12. Dannenberg AJ, Lippman SM, Mann JR, Subbaramaiah K, DuBois RN. Cyclooxygenase-2 and epidermal growth factor receptor: pharmacologic targets for chemoprevention. *J Clin Oncol.* 2005 Jan 10;23(2):254-66. doi: 10.1200/JCO.2005.09.112.
13. Gurram B, Zhang S, Li M, Li H, Xie Y, Cui H, Du J, Fan J, Wang J, Peng X. Celecoxib Conjugated Fluorescent Probe for Identification and Discrimination of Cyclooxygenase-2 Enzyme in Cancer Cells. *Anal Chem.* 2018 Apr 17;90(8):5187-5193. doi: 10.1021/acs.analchem.7b05337.
14. Esbona K, Yi Y, Saha S, Yu M, Van Doorn RR, Conklin MW, Graham DS, Wisinski KB, Ponik SM, Eliceiri KW, Wilke LG, Keely PJ. The Presence of Cyclooxygenase 2, Tumor-Associated Macrophages, and Collagen Alignment as Prognostic Markers for Invasive Breast Carcinoma Patients. *Am J Pathol.* 2018 Mar;188(3):559-573. doi: 10.1016/j.ajpath.2017.10.025.
15. Greenhough A, Smartt HJ, Moore AE, Roberts HR, Williams AC, Paraskeva C, Kaidi A. The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and

adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis*. 2009 Mar;30(3):377-86. doi: 10.1093/carcin/bgp014.

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

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

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

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

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

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

22.Chin YT, Wei PL, Ho Y, Nana AW, Changou CA, Chen YR, Yang YS, Hsieh MT, Hercbergs A, Davis PJ, Shih YJ, Lin HY. Thyroxine inhibits resveratrol-caused

apoptosis by PD-L1 in ovarian cancer cells. *Endocr Relat Cancer*. 2018 May;25(5):533-545. doi: 10.1530/ERC-17-0376.

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

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

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

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

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

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

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

30. Ohno S, Ohno Y, Suzuki N, Inagawa H, Kohchi C, Soma G, Inoue M. Multiple roles of cyclooxygenase-2 in endometrial cancer. *Anticancer Res.* 2005 Nov-Dec;25(6A):3679-87.
31. Mitacek MCG, Praderio RG, Stornelli MC, de la Sota RL, Stornelli MA. Endometritis in the bitch: Immunohistochemical localization of cyclooxygenase 2. *Open Vet J.* 2020 Aug;10(2):157-163. doi: 10.4314/ovj.v10i2.5.
32. Ye Y, Wang X, Jeschke U, von Schönfeldt V. COX-2-PGE2-EPs in gynecological cancers. *Arch Gynecol Obstet.* 2020 Jun;301(6):1365-1375. doi: 10.1007/s00404-020-05559-6.
33. Ohno S, Ohno Y, Suzuki N, Inagawa H, Kohchi C, Soma G, Inoue M. Multiple roles of cyclooxygenase-2 in endometrial cancer. *Anticancer Res.* 2005;25(6A):3679–3687.
34. Deng L, Liang H, Han Y. Cyclooxygenase-2 and β -Catenin as Potential Diagnostic and Prognostic Markers in Endometrial Cancer. *Front Oncol.* 2020 Feb 21;10:56. doi: 10.3389/fonc.2020.00056.
35. Liu Y, Li H, Zhao C, Jia H. MicroRNA-101 inhibits angiogenesis via COX-2 in endometrial carcinoma. *Mol Cell Biochem.* 2018 Nov;448(1-2):61-69. doi: 10.1007/s11010-018-3313-0.
36. Kosmas K, Mitropoulou G, Stamoulas M, Marouga A. Expression of cyclooxygenase-2 in imprint smears of endometrial carcinoma. *Diagn Cytopathol.* 2020 Nov;48(11):1086-1092. doi: 10.1002/dc.24481.
37. Li M, Li M, Wei Y, Xu H. Prognostic and Clinical Significance of Cyclooxygenase-2 Overexpression in Endometrial Cancer: A Meta-Analysis. *Front Oncol.* 2020 Aug 6;10:1202. doi: 10.3389/fonc.2020.01202.
38. Jarzabek K, Koda M, Walentowicz-Sadlecka M, Grabiec M, Laudanski P, Wolczynski S. Altered expression of ERs, aromatase, and COX2 connected to estrogen action in type 1 endometrial cancer biology. *Tumour Biol.* 2013 Dec;34(6):4007-16. doi: 10.1007/s13277-013-0991-9.
39. Faloppa CC, Baiocchi G, Cunha IW, Fregnani JH, Osorio CA, Fukazawa EM, Kumagai LY, Badiglian-Filho L, Pinto GL, Soares FA. NF- κ B and COX-2

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

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

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

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

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

44.Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021 May;71(3):209-249.

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

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

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

Перелік літературних джерел до розділу 2

1. 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.
2. Creasman W. Revised FIGO staging for carcinoma of the endometrium. *Int J Gynaecol Obstet.* 2009;105(2):109. doi: 10.1016/j.ijgo.2009.02.010.
3. Murali R, Davidson B, Fadare O, Carlson JA, Crum CP, Gilks CB, et al. High-grade Endometrial Carcinomas: Morphologic and Immunohistochemical Features, Diagnostic Challenges and Recommendations. *Int J Gynecol Pathol.* 2019 Jan;38 Suppl 1(Iss 1 Suppl 1):S40-S63. doi: 10.1097/PGP.0000000000000491.
4. Ming-Ping Wu, Yu-Jen Cheng, Yue-Shan Lin, Chieh-Yi Kang, Kuo-Feng Huang, Ching-Cherng Tzeng. Tumor/Normal Counterpart Microvessel Density Ratio has a Better Correlation with Clinicopathologic Parameters in Endometrial Carcinoma than Tumor Microvessel Density Alone, *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, Volume 43, Issue 4, 2004, Pages 199-205.
5. Zinovkin DA, Pranjol MZI, Petrenyov DR, Nadyrov EA, Savchenko OG. The Potential Roles of MELF-Pattern, Microvessel Density, and VEGF Expression in Survival of Patients with Endometrioid Endometrial Carcinoma: A Morphometrical and Immunohistochemical Analysis of 100 Cases. *J Pathol Transl Med.* 2017 Sep;51(5):456-462. doi: 10.4132/jptm.2017.07.19.
6. Liu M, Cai L, Li Q, Chen X, Gao L, Jiang L. The Expression of VEGF and CD31 in Endometrial Lesions and Its Associations with Blood Flow Parameters of Transvaginal 3D Power Doppler Ultrasonography: A Preliminary Study. *Cancer Manag Res.* 2020 Nov 4;12:11211-11218. doi: 10.2147/CMAR.S277274.
7. Ozalp S, Yalcin OT, Acikalin M, Tanir HM, Oner U, Akkoyunlu A. Microvessel density (MVD) as a prognosticator in endometrial carcinoma. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2003;24(3-4):305-8.

8. Wang JZ, Xiong YJ, Man GCW, Chen XY, Kwong J, Wang CC. Clinicopathological and prognostic significance of blood microvessel density in endometrial cancer: a meta-analysis and subgroup analysis. *Arch Gynecol Obstet.* 2018 Mar;297(3):731-740. doi: 10.1007/s00404-018-4648-1.
9. Kluz T, Łoziński T, Czekerowska S, Stachowicz N, Gurynowicz G, Chróściel M, Czekerowski A. Tumor budding index and microvessel density assessment in patients with endometrial cancer: A pilot study. *Oncol Lett.* 2020 Sep;20(3):2701-2710. doi: 10.3892/ol.2020.11811.
10. Czekerowski A, Czekerowska S, Czuba B, Cnota W, Sodowski K, Kotarski J, Zwirska-Korczała K. Microvessel density assessment in benign and malignant endometrial changes. *J Physiol Pharmacol.* 2008 Sep;59 Suppl 4:45-51.
11. Emoto M, Iwasaki H, Ishiguro M, Kikuchi M, Horiuchi S, Saito T, Tsukamoto N, Kawarabayashi T. Angiogenesis in carcinosarcomas of the uterus: differences in the microvessel density and expression of vascular endothelial growth factor between the epithelial and mesenchymal elements. *Hum Pathol.* 1999 Oct;30(10):1232-41. doi: 10.1016/s0046-8177(99)90043-6.
12. Ozbudak IH, Karaveli S, Simsek T, Erdogan G, Pestereli E. Neoangiogenesis and expression of hypoxia-inducible factor 1alpha, vascular endothelial growth factor, and glucose transporter-1 in endometrioid type endometrium adenocarcinomas. *Gynecol Oncol.* 2008 Mar;108(3):603-8. doi: 10.1016/j.ygyno.2007.11.028.
13. Kravtsova O.I., Lyndin M.S., Sikora V.V., Hyriavenko N.I., Kuzenko Y.V., Moskalenko R.A., Sikora K.O., Lyndina Y.M., Romaniuk A.M. The role of hsp70 and hsp90 in the endometrial carcinomas progression. *Azerbaijan Medical Journal (ATJ).* 2021;3:136-146.
14. Hyriavenko N, Lyndin M, Sikora K, Piddubnyi A, Karpenko L, Kravtsova O, Hyriavenko D, Diachenko O, Sikora V, Romaniuk A. Serous Adenocarcinoma of Fallopian Tubes: Histological and Immunohistochemical Aspects. *J Pathol Transl Med.* 2019 Jul;53(4):236-243. doi: 10.4132/jptm.2019.03.21.

15. Lytvynenko M, Shkolnikov V, Bocharova T, Sychova L, Gargin V. Peculiarities of proliferative activity of cervical squamous cancer in hiv infection. Georgian Med News. 2017 Sep;(270):10-15. PMID: 28972476.
16. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA Cancer J Clin. 2021 May;71(3):209-249.
17. Romaniuk A, Lyndin M, Moskalenko R, Kuzenko Y, Gladchenko O, Lyndina Y. Pathogenetic mechanisms of heavy metals effect on proapoptotic and proliferative potential of breast cancer. Interv Med Appl Sci. 2015 Jun;7(2):63-8.
18. Klyuchko KO, Gargin VV. Influence of neoadjuvant chemoradiotherapy for locally advanced cervical cancer. Pol Merkur Lekarski. 2020 Dec 22;48(288):406-409. PMID: 33387427.
19. Romanjuk A, Lyndin M, Moskalenko R, Gortinskaya O, Lyndina Y. The role of heavy metal salts in pathological biomineralization of breast cancer tissue. Adv Clin Exp Med. 2016 Sep-Oct;25(5):907-910.
20. Carmeliet P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. Oncology. 2005;69 Suppl 3:4-10.
21. Kounelis S, Kapranos N, Kouri E, Coppola D, Papadaki H, Jones MW. Immunohistochemical profile of endometrial adenocarcinoma: a study of 61 cases and review of the literature. Mod Pathol. 2000 Apr;13(4):379-88.
22. Lytvynenko MV, Narbutova TY, Vasylyev VV, Gargin VV. Indicators of proliferative activity of endometrium in women with immunodeficiency. AMJ. 2021;2:53-60. doi: 10.34921/amj.2021.2.008
23. Yao N, Song Z, Wang X, Yang S, Song H. Prognostic Impact of Progesterone Receptor Status in Chinese Estrogen Receptor Positive Invasive Breast Cancer Patients. J Breast Cancer. 2017;20(2):160-169. doi:10.4048/jbc.2017.20.2.160

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

Перелік літературних джерел до розділу 3

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

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

3. Tringale KR, Pang J, Nguyen QT. Image-guided surgery in cancer: A strategy to reduce incidence of positive surgical margins. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2018 May;10(3):e1412. doi: 10.1002/wsbm.1412.

4. Ratnavelu ND, Brown AP, Mallett S, Scholten RJ, Patel A, Founta C, Galaal K, Cross P, Naik R. Intraoperative frozen section analysis for the diagnosis of early stage ovarian cancer in suspicious pelvic masses. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016 Mar 1;3(3):CD010360. doi: 10.1002/14651858.CD010360.pub2.

5. Kung FY, Tsang AK, Yu EL. Intraoperative frozen section analysis of ovarian tumors: a 11-year review of accuracy with clinicopathological correlation in a Hong Kong Regional hospital. *Int J Gynecol Cancer*. 2019 May;29(4):772-778. doi: 10.1136/ijgc-2018-000048.

6. Yoshida H, Tanaka H, Tsukada T, Abeto N, Kobayashi-Kato M, Tanase Y, Uno M, Ishikawa M, Kato T. Diagnostic Discordance in Intraoperative Frozen Section Diagnosis of Ovarian Tumors: A Literature Review and Analysis of 871 Cases Treated at a Japanese Cancer Center. *Int J Surg Pathol*. 2021 Feb;29(1):30-38. doi: 10.1177/1066896920960518.

7. Thurber GM, Figueiredo JL, Weissleder R. Detection limits of intraoperative near infrared imaging for tumor resection. *J Surg Oncol*. 2010 Dec 1;102(7):758-64. doi: 10.1002/jso.21735.
8. Lwin TM, Hoffman RM, Bouvet M. Unique Benefits of Tumor-Specific Nanobodies for Fluorescence Guided Surgery. *Biomolecules*. 2021 Feb 18;11(2):311. doi: 10.3390/biom11020311.
9. Pischik VG, Kovalenko A. The role of indocyanine green fluorescence for intersegmental plane identification during video-assisted thoracoscopic surgery segmentectomies. *J Thorac Dis*. 2018 Nov;10(Suppl 31):S3704-S3711. doi: 10.21037/jtd.2018.04.84.
10. Muyskens M. The Fluorescence of Lignum nephriticum: A Flash Back to the Past and a Simple Demonstration of Natural Substance Fluorescence; Ed Vitz. *Journal of Chemical Education*. 2006;83(5):765. doi: 10.1021/ed083p765
11. Liu G, Zhao Y. Switching between Phosphorescence and Fluorescence Controlled by Chiral Self-Assembly. *Adv Sci (Weinh)*. 2017 May 15;4(9):1700021. doi: 10.1002/advs.201700021.
12. Acuña AU, Amat-Guerri F, Morcillo P, Liras M, Rodríguez B. Structure and formation of the fluorescent compound of Lignum nephriticum. *Org Lett*. 2009 Jul 16;11(14):3020-3. doi: 10.1021/ol901022g.
13. Debie P, Hernot S. Emerging Fluorescent Molecular Tracers to Guide Intra-Operative Surgical Decision-Making. *Front Pharmacol*. 2019 May 14;10:510. doi: 10.3389/fphar.2019.00510.
14. Rijpkema M, Bos DL, Cornelissen AS, Franssen GM, Goldenberg DM, Oyen WJ, Boerman OC. Optimization of Dual-Labeled Antibodies for Targeted Intraoperative Imaging of Tumors. *Mol Imaging*. 2015;14:348-55. doi: 10.2310/7290.2015.00015
15. Troyan SL, Kianzad V, Gibbs-Strauss SL, Gioux S, Matsui A, Oketokoun R, Ngo L, Khamene A, Azar F, Frangioni JV. The FLARE intraoperative near-infrared fluorescence imaging system: a first-in-human clinical trial in breast cancer

sentinel lymph node mapping. *Ann Surg Oncol*. 2009 Oct;16(10):2943-52. doi: 10.1245/s10434-009-0594-2.

16. Brouwer OR, Buckle T, Vermeeren L, Klop WM, Balm AJ, van der Poel HG, van Rhijn BW, Horenblas S, Nieweg OE, van Leeuwen FW, Valdés Olmos RA. Comparing the hybrid fluorescent-radioactive tracer indocyanine green-99mTc-nanocolloid with 99mTc-nanocolloid for sentinel node identification: a validation study using lymphoscintigraphy and SPECT/CT. *J Nucl Med*. 2012 Jul;53(7):1034-40. doi: 10.2967/jnumed.112.103127.

17. Hernandez Vargas S, Ghosh SC, Azhdarinia A. New Developments in Dual-Labeled Molecular Imaging Agents. *J Nucl Med*. 2019 Apr;60(4):459-465. doi: 10.2967/jnumed.118.213488.

18. Luker GD, Luker KE. Optical imaging: current applications and future directions. *J Nucl Med*. 2008;49:1–4. doi: 10.2967/jnumed.107.045799

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

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

21. Lese I, Leckenby JI, Taddeo A, Constantinescu M, Olariu R. Lymph node identification in skin malignancy using indocyanine green transcutaneously study: Study protocol for a diagnostic accuracy study. *Medicine (Baltimore)*. 2019 Nov;98(44):e17839. doi: 10.1097/MD.0000000000017839.

22. Teramoto Y, Nakamura Y, Asami Y, Matsuya T, Brinker TJ, Jansen P, Schulz A, Stoffels I, Klode J, Schadendorf D, Yamamoto A. Intraoperative use of LIGHTVISION: a novel fluorescence navigation system using indocyanine green

for sentinel lymph node biopsy in skin cancer patients. *Eur J Dermatol.* 2018 Aug 1;28(4):532-534. doi: 10.1684/ejd.2018.3308.

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

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

25. Namikawa K, Yamazaki N. Sentinel lymph node biopsy guided by indocyanine green fluorescence for cutaneous melanoma. *Eur J Dermatol.* 2011 Mar-Apr;21(2):184-90. doi: 10.1684/ejd.2010.1237.

26. Boni L, David G, Mangano A, Dionigi G, Rausei S, Spampatti S, Cassinotti E, Fingerhut A. Clinical applications of indocyanine green (ICG) enhanced fluorescence in laparoscopic surgery. *Surg Endosc.* 2015 Jul;29(7):2046-55. doi: 10.1007/s00464-014-3895-x.

27. Diana M, Liu YY, Pop R, Kong SH, Legnèr A, Beaujeux R, Pessaux P, Soler L, Mutter D, Dallemagne B, Marescaux J. Superselective intra-arterial hepatic injection of indocyanine green (ICG) for fluorescence image-guided segmental positive staining: experimental proof of the concept. *Surg Endosc.* 2017 Mar;31(3):1451-1460. doi: 10.1007/s00464-016-5136-y.

28. Solórzano CC, Thomas G, Berber E, Wang TS, Randolph GW, Duh QY, Triponez F. Current state of intraoperative use of near infrared fluorescence for parathyroid identification and preservation. *Surgery.* 2021 Apr;169(4):868-878. doi: 10.1016/j.surg.2020.09.014.

29. Moody ED, Viskari PJ, Colyer CL. Non-covalent labeling of human serum albumin with indocyanine green: a study by capillary electrophoresis with diode laser-induced fluorescence detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1999 Jun 11;729(1-2):55-64. doi: 10.1016/s0378-4347(99)00121-8.
30. Ogawa M, Kosaka N, Choyke PL, Kobayashi H. In vivo molecular imaging of cancer with a quenching near-infrared fluorescent probe using conjugates of monoclonal antibodies and indocyanine green. *Cancer Res.* 2009 Feb 15;69(4):1268-72. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3116.
31. Sabapathy V, Mentam J, Jacob PM, Kumar S. Noninvasive Optical Imaging and In Vivo Cell Tracking of Indocyanine Green Labeled Human Stem Cells Transplanted at Superficial or In-Depth Tissue of SCID Mice. *Stem Cells Int.* 2015;2015:606415. doi: 10.1155/2015/606415.
32. de Graaf W, Häusler S, Heger M, van Ginhoven TM, van Cappellen G, Bennink RJ, Kullak-Ublick GA, Hesselmann R, van Gulik TM, Stieger B. Transporters involved in the hepatic uptake of (99m)Tc-mebrofenin and indocyanine green. *J Hepatol.* 2011 Apr;54(4):738-45. doi: 10.1016/j.jhep.2010.07.047.
33. Huang L, Vore M. Multidrug resistance p-glycoprotein 2 is essential for the biliary excretion of indocyanine green. *Drug Metab Dispos.* 2001 May;29(5):634-7. PMID: 11302927.
34. Halilbasic E, Claudel T, Trauner M. Bile acid transporters and regulatory nuclear receptors in the liver and beyond. *J Hepatol.* 2013 Jan;58(1):155-68. doi: 10.1016/j.jhep.2012.08.002.
35. Leung N, Furniss D, Giele H. Modern surgical management of breast cancer therapy related upper limb and breast lymphoedema. *Maturitas.* 2015 Apr;80(4):384-90. doi: 10.1016/j.maturitas.2015.01.012.
36. Polom W, Markuszewski M, Rho YS, Matuszewski M. Usage of invisible near infrared light (NIR) fluorescence with indocyanine green (ICG) and methylene blue (MB) in urological oncology. Part 1. *Cent European J Urol.* 2014;67(2):142-8. doi: 10.5173/ceju.2014.02.art5.

37. Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, Reulen HJ; ALA-Glioma Study Group. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol.* 2006 May;7(5):392-401. doi: 10.1016/S1470-2045(06)70665-9.
38. Shimizu S, Kamiike W, Hatanaka N, Yoshida Y, Tagawa K, Miyata M, Matsuda H. New method for measuring ICG Rmax with a clearance meter. *World J Surg.* 1995 Jan-Feb;19(1):113-8; discussion 118. doi: 10.1007/BF00316992.
39. Ginimuge PR, Jyothi SD. Methylene blue: revisited. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol.* 2010 Oct;26(4):517-20. PMID: 21547182
40. De Leeuw F, Breuskin I, Abbaci M, Casiraghi O, Mirghani H, Ben Lakhdar A, Laplace-Builhé C, Hartl D. Intraoperative Near-infrared Imaging for Parathyroid Gland Identification by Auto-fluorescence: A Feasibility Study. *World J Surg.* 2016 Sep;40(9):2131-8. doi: 10.1007/s00268-016-3571-5.
41. Zhang C, Jiang D, Huang B, Wang C, Zhao L, Xie X, Zhang Z, Wang K, Tian J, Luo Y. Methylene Blue-Based Near-Infrared Fluorescence Imaging for Breast Cancer Visualization in Resected Human Tissues. *Technol Cancer Res Treat.* 2019 Jan-Dec;18:1533033819894331. doi: 10.1177/1533033819894331.
42. Jiang L, Liu T, Wang X, Li J, Zhao H. Real-time near-infrared fluorescence imaging mediated by blue dye in breast cancer patients. *J Surg Oncol.* 2020 May;121(6):964-966. doi: 10.1002/jso.25874.
43. Hariharan U, Sood R, Choudhury A, Garg R, Kaur J. Oxygen desaturation following methylene blue injection: Not always spurious. *Saudi J Anaesth.* 2011 Jan;5(1):113-4. doi: 10.4103/1658-354X.76471.
44. Patel HP, Chadwick DR, Harrison BJ, Balasubramanian SP. Systematic review of intravenous methylene blue in parathyroid surgery. *Br J Surg.* 2012 Oct;99(10):1345-51. doi: 10.1002/bjs.8814.
45. Vutskits L, Briner A, Klauser P, Gascon E, Dayer AG, Kiss JZ, Muller D, Licker MJ, Morel DR. Adverse effects of methylene blue on the central nervous

system. *Anesthesiology*. 2008 Apr;108(4):684-92. doi: 10.1097/ALN.0b013e3181684be4.

46. Hillary SL, Guillermet S, Brown NJ, Balasubramanian SP. Use of methylene blue and near-infrared fluorescence in thyroid and parathyroid surgery. *Langenbecks Arch Surg*. 2018 Feb;403(1):111-118. doi: 10.1007/s00423-017-1641-2.

47. Matsui A, Tanaka E, Choi HS, Kianzad V, Gioux S, Lomnes SJ, Frangioni JV. Real-time, near-infrared, fluorescence-guided identification of the ureters using methylene blue. *Surgery*. 2010 Jul;148(1):78-86. doi: 10.1016/j.surg.2009.12.003.

48. Bach KK, Lindsay FW, Berg LS, Howard RS. Prolonged postoperative disorientation after methylene blue infusion during parathyroidectomy. *Anesth Analg*. 2004 Nov;99(5):1573-1574. doi: 10.1213/01.ANE.0000134860.73875.CF.

49. Majithia A, Stearns MP. Methylene blue toxicity following infusion to localize parathyroid adenoma. *J Laryngol Otol*. 2006 Feb;120(2):138-40. doi: 10.1017/S0022215105005098.

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

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

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

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

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

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

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

57. Jakola AS, Myrnel KS, Kloster R, Torp SH, Lindal S, Unsgård G, Solheim O. Comparison of a strategy favoring early surgical resection vs a strategy favoring watchful waiting in low-grade gliomas. *JAMA*. 2012 Nov 14;308(18):1881-8. doi: 10.1001/jama.2012.12807.

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

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

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

61. Hadjipanayis CG, Widhalm G, Stummer W. What is the Surgical Benefit of Utilizing 5-Aminolevulinic Acid for Fluorescence-Guided Surgery of Malignant

Gliomas? Neurosurgery. 2015 Nov;77(5):663-73. doi: 10.1227/NEU.0000000000000929.

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

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

64. Wang L, Gaigalas AK, Blasic J, Holden MJ. Spectroscopic characterization of fluorescein- and tetramethylrhodamine-labeled oligonucleotides and their complexes with a DNA template. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2004 Oct;60(12):2741-50. doi: 10.1016/j.saa.2004.01.013.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

78. Javaheri A, Kruse T, Moonens K, Mejías-Luque R, Debraekeleer A, Asche CI, Tegtmeyer N, Kalali B, Bach NC, Sieber SA, Hill DJ, Königer V, Hauck CR, Moskalenko R, Haas R, Busch DH, Klaile E, Slevogt H, Schmidt A, Backert S, Remaut H, Singer BB, Gerhard M. *Helicobacter pylori* adhesin HopQ engages in a virulence-enhancing interaction with human CEACAMs. *Nat Microbiol.* 2016 Oct 17;2:16189. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.189.

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

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

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

82. Hollandsworth HM, Amirfakhri S, Filemoni F, Schmitt V, Wennemuth G, Schmidt A, Hoffman RM, Singer BB, Bouvet M. Anti-carcinoembryonic antigen-

related cell adhesion molecule antibody for fluorescence visualization of primary colon cancer and metastases in patient-derived orthotopic xenograft mouse models. *Oncotarget*. 2020 Jan 28;11(4):429-439. doi: 10.18632/oncotarget.27446.