

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ  
ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ПОСЛАВСЬКА ОЛЕКСАНДРА ВОЛОДИМИРІВНА



УДК: 616-006.04-076-097.3-079.4

**ДІАГНОСТИКА АНАПЛАСТИЧНИХ ПУХЛИН ТА ПУХЛИН БЕЗ  
ВСТАНОВЛЕНОЇ ПЕРВИННОЇ ЛОКАЛІЗАЦІЇ:  
ІМУНОМОРФОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ**

14.03.02 – патологічна анатомія

Автореферат дисертації на здобуття наукового  
ступеня доктора медичних наук

Запоріжжя – 2020

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України».

**Науковий керівник** – заслужений діяч науки і техніки України, доктор медичних наук, професор **Шпонька Ігор Станіславович**, перший проректор, професор кафедри патологічної анатомії і судової медицини ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України».

**Офіційні опоненти:**

доктор медичних наук, професор **Дядик Олена Олександрівна**, завідувач кафедри патологічної та топографічної анатомії Національної медичної академії післядипломної освіти імені П.Л. Шупика МОЗ України;

доктор медичних наук, професор **Гичка Сергій Григорович**, завідувач кафедри патологічної анатомії №2 Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця МОЗ України;

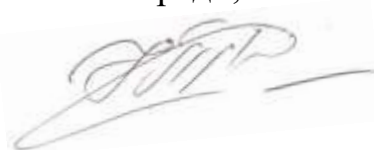
доктор медичних наук, професор **Романюк Анатолій Миколайович**, завідувач кафедри патологічної анатомії Медичного інституту Сумського державного університету МОЗ України.

Захист відбудеться « 4 » лютого 2021 року об 11<sup>00</sup> годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 17.600.04 Запорізького державного медичного університету МОЗ України (69035, м. Запоріжжя, просп. Маяковського, 26).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Запорізького державного медичного університету МОЗ України (69035, м. Запоріжжя, просп. Маяковського, 26).

Автореферат розісланий « 29 » грудня 2020 року.

Учений секретар спеціалізованої вченої ради,  
к.мед.н. доцент



Т.В. Іваненко

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Обґрунтування вибору теми дослідження.** Найвагомішу частку недиференційованих (анапластичних) пухлин з труднощами верифікації джерела походження складають метастатичні карциноми. Це гетерогенна група злоякісних пухлин епітеліального гістогенезу, що залишаються анонімними навіть після ретельного клініко-морфологічного дослідження. Для статистичного обліку їх об'єднують в клініко-морфологічний синдром «Раки невідомої первинної локалізації» (РНПЛ). Серед них аденокарциноми (АК) традиційно залишаються найбільш частим гістологічним типом пухлин, походження яких стає диференціально-діагностичною проблемою (Tomuleasa C. et al., 2017; Gatalica Z. et al., 2018; Greco F. A., 2013; Ross J. S. et al., 2015; Löffler H. et al., 2016).

Багато робіт останніх років присвячені проблемі РНПЛ, так званим CUP (cancer of unknown primary site) або MUO (malignancy of unknown origin), що відрізняються агресивним клінічним перебігом, нетиповим малюнком метастатичного процесу, швидким прогресуванням дисемінації, хромосомною нестабільністю, поганою реакцією на хіміотерапію (Wang X.-Y. et al., 2019; Трякин А. А. та співавт., 2018; Greco F. A., 2013). Середній термін виживання пацієнтів з РНПЛ складає вісім місяців при метастазах, що вражають лише регіональні лімфатичні вузли і три місяці - за умови екстранодальної дисемінації (Mills S. E., Carter D., Greenson J. K., 2010; Hanahan D., Weinberg R. A., 2011; Subbiah I. M. et al., 2017; Smith-Gagen J. et al., 2019).

За даними світової статистики, РНПЛ складають 3-5 % всіх метастатичних пухлин, з них тільки 20 % мають відносно сприятливий прогноз, тому що відповідають на місцеве і/або системне лікування і демонструють вищий відсоток виживання серед пацієнтів (Vajdic S. M., Goldstein D., 2015). При визначенні фенотипу та прогнозуванні перебігу РНПЛ, окрім імуноморфологічних характеристик, враховуються й клінічні дані: вік, стать, лабораторні аналізи, локалізація метастазів, дані УЗД, КТ, МРТ, тощо (Greco F. A., 2013; Федоренко З. П. та співавт., 2017; Lebok P. et al., 2016; Комаров І. Г., Слетина С. Ю., 2015; Smeds J. et al., 2002); Пилипенко М. І., Лісовий В. М., 2018).

На підставі класифікації Австралійського Національного інституту з догляду за здоров'ям (National Institute for Health and Care Excellence) встановлено три категорії верифікації РНПЛ: категорія 1 – "злоякісні пухлини невідомого походження", діагноз яких визначається тільки на підставі даних клінічного обстеження; категорія 2 – "попередній РНПЛ" виставляється після рутинного морфологічного дослідження та залишається як діагноз у випадку метастазів недиференційованих карцином і відсутності клінічних проявів; категорія 3 "підтверджений РНПЛ" – дійсно первинно-дисемінована пухлина, коли КТ, гістологія біопсійного матеріалу, ІГХ та FISH не допомагають

визначитись з походженням карциноми (Vajdic S. M., Goldstein D., 2015).

В Україні серед людей похилого віку біля 50 % анонімних недиференційованих (анапластичних) метастазів можуть бути класифіковані як "попередній РНПЛ" (категорія 2) внаслідок відсутності фінансової можливості зробити комерційні дослідження КТ, ІГХ або FISH, і їх діагностика залишається на рівні гістологічного дослідження з діагнозом «метастаз недиференційованого раку» або «низькодиференційована аденокарцинома невідомого походження». Розподіл категорій верифікації РНПЛ в Україні невідомий, через відсутність відповідних статистичних показників. В ситуації «незрозумілого» діагнозу необхідно з'ясувати, це рідка пухлина синдрому «РНПЛ», чи недоліки обстеження, що вимагає аналізу результативності діагностичних заходів.

Але незважаючи на численні публікації, біологія цієї групи карцином залишається майже невідомою, тому що у 15-25 % випадків, первина локалізація не може бути ідентифікована навіть під час розтину (Greco F. A., 2013). Хіміорезистентність та несприятливі результати лікування у пацієнтів з РНПЛ вимагають покращення якості діагностики для визначення чутливих до таргетної терапії імунофенотипів, що обумовило вибір нами дослідження даної проблеми.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертація є фрагментом науково-дослідницьких робіт кафедри патологічної анатомії і судової медицини ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України» «Патоморфологічна діагностика та прогноз перебігу новоутворень різних локалізацій з урахуванням маркерів біологічних властивостей» (номер державної реєстрації 0112U006965, терміни виконання 2012-2015рр.), «Розробка діагностичних та прогностичних критеріїв новоутворень різних локалізацій з урахуванням біологічних показників активності пухлинного процесу» (номер державної реєстрації 0116U002827, терміни виконання 2016-2018рр.), в яких автор була відповідальним виконавцем, та «Морфологічні та молекулярно-генетичні критерії діагностики та прогнозу перебігу передпухлинних станів та новоутворень різних локалізацій» (номер державної реєстрації 0119U100027, терміни виконання 2019-2022рр.), в якій здобувач є співвиконавцем.

Тема дисертації була затверджена вченою радою ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України» (протокол № 09 від 24 квітня 2014 року).

**Мета дослідження.** Удосконалити алгоритми імуногістохімічної діагностики недиференційованих (анапластичних) пухлин та пухлин без встановленої первинної локалізації на підставі вивчення показників експресії маркерів молекулярно-біологічних властивостей клітин та морфометричних показників.

**Завдання дослідження:**

1. Провести морфометричне дослідження ядер клітин пухлин

різного гістогенезу для формування об'єктивних критеріїв визначення категорій «дрібно-», «середньо-» та «великоклітинні пухлини»; визначити морфометричні характеристики категорії «дрібно-кругло-синьо-клітинні пухлини» для подальшої індивідуалізації імуногістохімічної панелі маркерів.

2. Визначити частку пухлин невідомого походження після проведення імуногістохімічного дослідження, що припадає на третю категорію верифікації недиференційованих (анапластичних) пухлин «підтверджений рак невідомої первинної локалізації»; порівняти отримані дані з показниками світової статистики.

3. Дослідити вікові, імуноморфологічні та морфометричні характеристики спостережень ізольованого папілярного канцероматозу у жінок, як імунофенотипу клініко-морфологічного синдрому «Рак невідомої первинної локалізації», в порівнянні з первинними пухлинами яєчників; дослідити припущення щодо єдиного джерела походження серозного папілярного канцероматозу у жінок і серозної «high-grade» аденокарциноми яєчників із ділянок інтраепітеліальної неоплазії епітелію маткової труби.

4. Визначити вікові, імуноморфологічні та морфометричні характеристики спостережень метастазів аденокарцином в однібічні аксиллярні лімфатичні вузли у жінок, як імунофенотипу клініко-морфологічного синдрому «Рак невідомої первинної локалізації», в порівнянні з первинними карциномами молочної залози.

5. Порівняти вікові, імуноморфологічні та морфометричні характеристики спостережень метастазів карцином кісток у чоловіків з підвищеним рівнем сироваткового PSA, як імунофенотипу клініко-морфологічного синдрому «Рак невідомої первинної локалізації», з характеристиками первинних карцином передміхурової залози.

6. Дослідити клінічні, імуноморфологічні та морфометричні характеристики метастазів аденокарцином колоректального профілю [СК 20 (+), СК 7 (-), CDX-2 (+)], як імунофенотипу клініко-морфологічного синдрому «Рак невідомої первинної локалізації», в порівнянні з первинними коло ректальними карциномами.

7. Визначити клінічні, імуноморфологічні та морфометричні особливості низькодиференційованої ембріональної карциноми з групи пухлин екстрагонадного зародково-клітинного синдрому, як імунофенотипу клініко-морфологічного синдрому «Рак невідомої первинної локалізації», в порівнянні з верифікованими фенотипами пухлин з герміногенних клітин.

8. Дослідити вікові, імуноморфологічні та морфометричні особливості ізольованих метастазів плоскоклітинного раку в лімфатичні вузли ший й, окремо, в пахові лімфатичні вузли, як імунофенотипи клініко-морфологічного синдрому «Рак невідомої первинної локалізації», в порівнянні з первинними плоскоклітинними раками голови та ший й первинними плоскоклітинними раками статевих органів відповідно.

9. Порівняти клінічні, імуноморфологічні та морфометричні

характеристики метастазів нейроендокринних карцином, а також окремо метастазів карцином з клітин Меркеля, як імунофенотипів клініко-морфологічного синдрому «Рак невідомої первинної локалізації», з дрібноклітинними карциномами легенів та первинними карциномами з клітин Меркеля відповідно.

10. Дослідити у спостереженнях сприятливих імунофенотипів клініко-морфологічного синдрому «Рак невідомої первинної локалізації» експресію маркерів p16<sup>INK4A</sup>, HER-2/neu імуногістохімічним методом та генетичних ушкоджень відповідних генів CDKN2A та ERBB2 методом FISH для виявлення можливих шляхів канцерогенезу дисемінованих пухлин.

*Об'єкт дослідження:* метастази низькодиференційованих та недиференційованих пухлин невідомого походження з фокусом на метастази карцином сприятливих імунофенотипів клініко-морфологічного синдрому «Рак невідомої первинної локалізації».

*Предмет дослідження:* алгоритми імуногістохімічної діагностики метастазів низькодиференційованих та недиференційованих пухлин невідомого походження з урахуванням показників цифрової морфометрії ядер клітин пухлин.

*Методи дослідження:* патоморфологічний (оцінка гістологічного варіанту пухлини, ступеня її диференціювання та вторинних змін в пухлині); морфометричний (підрахунок числа мітозів, визначення розмірів морфологічних об'єктів (ядер клітин) на мікрофотографіях зрізів за площею, периметром та «коефіцієнтом круглості» в програмі ImageJ, розрахунок індексів інтрануклеарної експресії маркерів плагіном ImmunoRatio в програмі ImageJ); імуногістохімічний (визначення експресії діагностичних та прогностичних імуногістохімічних маркерів за допомогою моноклональних антитіл та системи візуалізації Quanto (TermoScientific, США)); метод флуоресцентної гібридизації in situ (визначення ампліфікації гену ERBB2 та делеції локусу 9p21 ДНК-зондом з подвійною міткою для гену та відповідної хромосоми); статистичний аналіз отриманих результатів.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Вперше визначені об'єктивні діагностичні діапазони морфометричних показників площі, периметру та коефіцієнту круглості ядер клітин для категорій «дрібноклітинні пухлини», «середньоклітинні пухлини», «великоклітинні пухлини» та окремо для «дрібно-кругло-синьо-клітинні пухлини», порівняно з розмірами звичайних лімфоцитів у програмі з обробки цифрових зображень ImageJ. Отримані нові дані щодо об'єктивних параметрів «площа», «периметр» та «коефіцієнт круглості» ядер клітин метастатичних пухлин різного гістогенезу, верифікованих імуногістохімічним методом. Підтверджено єдине джерело походження серозного папілярного канцероматозу у жінок з імунофенотипом [CK 7 (+), CA-125 (+), CK 20 (-), ER (+), PAX-8 (+), WT-1 (+), p16<sup>INK4A</sup> (+), p53 (+)] та серозної аденокарциноми яєчників варіанту «high-grade» з інтраепітеліальної неоплазії

дистальних фрагментів маткової труби, що дозволяє виключити такий імунофенотип ізольованого канцероматозу з клініко-морфологічного синдрому «Рак невідомої первинної локалізації». Розширені наукові уявлення про вікові, гендерні, гістологічні, імуногістохімічні та морфометричні особливості сприятливих імунофенотипів клініко-морфологічного синдрому «Рак невідомої первинної локалізації» для розуміння унікальної біології первинно-дисемінованих карцином, в порівнянні з відповідними місцево-розповсюдженими карциномами. Подальшого розвитку набули дослідження щодо відповідності змін експресії епідермального фактору росту HER-2/neu до ампліфікації гену ERBB2 і експресії онкопротеїну p16<sup>INK4A</sup> до делеції локусу 9p21 гену CDKN2A в метастатичних карциномах невідомої первинної локалізації.

**Практичне значення одержаних результатів.** Для підвищення якості і швидкості верифікації недиференційованих (анапластичних), низькодиференційованих пухлин та метастазів пухлин з невідомих первинних джерел був оптимізований діагностичний алгоритм: запропоновано до проведення імуногістохімічних досліджень на етапі аналізу зрізів, забарвлених гематоксиліном і еозином, застосування цифрової морфометрії з використанням програми ImageJ. При визначенні значень морфометричних параметрів «дрібно-кругло-синьо-клітинних пухлин» (30 – 45 мкм<sup>2</sup> за площею, 25 – 35 мкм за периметром та 0,75 – 0,90 за показником круглості) рекомендовано міняти стандартну первинну імуногістохімічну панель [Pan CK AE1/3, Vimentin, CD45, S100 i/або HMB45] на [Pan CK AE1/3, Desmin, CD45, CD56, CD99, S100 i/або HMB45], що зразу охоплює більшість нозологічних одиниць цієї категорії пухлин. З'ясовані імуногістохімічні та морфометричні характеристики дев'яти відносно сприятливих імунофенотипів клініко-морфологічного синдрому «Рак невідомої первинної локалізації», за якими вони можуть бути трактовані як потенційно курабельні дисеміновані форми карцином відомих джерел. Доведена більша точність FISH методу в діагностиці делеції 9p21 / CDKN2A та ампліфікації ERBB2, порівняно з імуногістохімічним методом, який визначає їх не прямим шляхом, а через продукти ядерно-цитоплазматичної експресії p16<sup>INK4A</sup> та мембранної надекспресії HER-2/neu відповідно. За результатами проведених досліджень визначено, що частка метастатичних пухлин третьої категорії верифікації «підтверджені раки невідомої первинної локалізації», значно перевищує світові показники (21,95 % проти 3-5 %), що піднімає практичне питання міждисциплінарної комунікації та якості обстеження пацієнтів на «до-біопсійному етапі».

Отримано патент України на корисну модель № 111478 та інформаційний лист № 68-2019 про нововведення в системі охорони здоров'я за розробку «Спосіб прогнозування метастазів плоскоклітинного раку гортані».

Матеріали дисертаційної роботи впроваджено у практичну діяльність

КЗ «Дніпропетровське обласне патологоанатомічне бюро» (м. Дніпро), патологоанатомічного відділення КЗ «Міська клінічна лікарня №4 Дніпровської міської ради» (м. Дніпро), КЗ «Полтавське обласне патологоанатомічне бюро» (м. Полтава), КЗ «Одеське обласне патологоанатомічне бюро» (м. Одеса), патологоанатомічного відділення Кіровоградської обласної лікарні (м. Кропивницький), а також в педагогічний процес кафедри патологічної анатомії і судової медицини ДЗ «Дніпропетровська медична академія» МОЗ України, кафедри патологічної анатомії і судової медицини Запорізького державного медичного університету МОЗ України, кафедри патологічної анатомії ВДНЗ «Буковинський державний медичний університет», кафедри патологічної анатомії Харківського національного медичного університету, кафедри патологічної анатомії Медичного інституту Сумського державного університету, кафедри патологічної анатомії з секційним курсом Української медичної стоматологічної академії, кафедри патологічної анатомії ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет», кафедри патологічної та топографічної анатомії НМАПО імені П.Л. Шупика.

**Особистий внесок дисертанта.** Внесок здобувача в результати дисертаційного дослідження є основним і полягає в розробці наукової концепції дисертаційної роботи, виконанні патентного пошуку, аналізі фахової літератури за темою, систематизації клінічних, гістологічних та імуногістохімічних даних документації архівного матеріалу, створення комп'ютерної бази даних, власноручного проведення цифрової морфометрії мікрофотографій зрізів в програмі ImageJ. Автор самостійно сформувала рекомендації для покращення діагностики відносно сприятливих фенотипів синдрому «Рак невідомої первинної локалізації», дослідила експресії прогностичних маркерів p16<sup>INK4A</sup>, HER-2/neu та можливих генетичних ушкоджень FISH методом в відповідних генах CDKN2A та ERBB2, що дозволяють прогнозувати перебіг онкозахворювання і відповідь на терапію. Особисто виконала статистичну обробку результатів та впровадження їх в практику. У наукових працях, які опубліковані у співавторстві, подано фактичний матеріал досліджень здобувача, не були використані результати та ідеї співавторів публікацій.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення дисертації були представлені й обговорені на II Міжнародній науково-практичній конференції студентів та молодих вчених «Актуальні питання теоретичної та практичної медицини» (м. Суми, 16-18 квітня 2014 р.); Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів «Здобутки теоретичної медицини - в практику охорони здоров'я» (м. Запоріжжя, 24-25 березня 2016 р.); науково-практичній конференції з міжнародною участю, присвяченій 150-річчю з дня народження Д. К. Заболотного «Сучасні теоретичні та практичні аспекти клінічної медицини» (м. Одеса, 21-22 квітня 2016 р.); XX Міжнародному медичному конгресі студентів та молодих вчених



«Сучасні погляди на актуальні питання теоретичної, експериментальної та практичної медицини» (м. Тернопіль, 25-27 квітня 2016 р.); XVI Міжнародній конференції студентів та молодих учених «Новини і перспективи медичної науки» (м. Дніпропетровськ, 2016 р.); Всеукраїнської наукової конференції «Актуальні питання біології та медицини» (м. Суми, 16-17 листопада 2017 р.); 2 Colloque international francophone et Ukraine «Langues, Sciences et Pratiques» (Dnipro, 3-4 octobre, 2018); Другій всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Теорія та практика сучасної морфології» (м. Дніпро, 10-12 жовтня 2018 р.); II Міжнародній науковій конференції «Сьогодення біологічної науки» (м. Суми, 9-10 листопада 2018 р.); X Конгресі Асоціації патологів України «Перспективи розвитку сучасної патології» (м. Івано-Франківськ, 27-28 вересня 2018 р.); Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих учених «Медична наука в практику охорони здоров'я» (м. Полтава, 16 листопада 2018 р.); III International scientific and practical conference “Scientific Research Priorities: theoretical and practical value” (Nowy Sacz, Poland, 27-30 листопада 2018 р.); науково-практичній конференції молодих вчених «Фундаментальна медицина: інтегральні підходи до терапії хворих з онкологією» (м. Київ, 4-5 лютого 2019 р.); міжнародній практично-науковій конференції «Сучасна патоморфологічна діагностика в клінічній практиці лікаря» (м. Вінниця, 10-11 квітня 2019 р.); 3 Colloque international francophone en Ukraine «Langues, Sciences et Pratiques» (м. Одеса, 3-4 жовтня, 2019 р.); Третій всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Теорія та практика сучасної морфології» (м. Дніпро, 9-11 жовтня 2019 р.),

а також на засіданні кафедр патологічної анатомії і судової медицини, гістології, медичної біології, фармакогнозії та ботаніки, клінічної анатомії, анатомії і оперативної хірургії ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України» 18.06.2020 р.

**Публікації.** За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 39 наукових праць, серед яких 21 стаття у провідних фахових журналах України та 1 в закордонному науковому фаховому журналі, що індексуються міжнародними наукометричними базами, зокрема 4 з них в базі Web of Science, (з них 6 – без співавторів); 15 тез в матеріалах міжнародних і всеукраїнських науково-практичних конференцій. Отримано 1 патент України на корисну модель № 111478 та 1 інформаційний лист № 68-2019 про нововведення в системі охорони здоров'я.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертацію викладено на 308 сторінках друкованого тексту, вона складається з анотацій, вступу, 7 розділів (у тому числі огляд літератури, опис матеріалів і методів, 4 розділів власних досліджень), аналізу й узагальнення отриманих результатів, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних джерел літератури, який містить 308 найменувань (93 кирилицею і 215 латиною), а також додатків. Роботу ілюстровано 48 таблицями і 72 рисунками.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

**Матеріали і методи дослідження.** Всього досліджено 716 зразків біопсійного і / або операційного матеріалу пацієнтів з пухлинами або метастазами пухлин різних локалізацій: для I етапу було відібрано 41 випадок неопластичних уражень лімфатичних вузлів шиї (ЛВШ); для II етапу – 614 спостережень метастазів пухлин дев'яти сприятливих імунофенотипів клініко-морфологічного синдрому РНПЛ та випадки еталонних первинних місцево-розповсюджених пухлин подібних імунофенотипів; для III етапу – 61 спостереження РНПЛ для FISH дослідження (рис. 1).

Загальна кількість спостережень (n=716)		
I етап	<b>n<sub>I</sub>=41</b> Неопластичні ураження ЛВШ різного гістогенезу (n <sub>I</sub> =41)	<b>Мета:</b> МФМ пухлин різного гістогенезу в ImageJ; формування МФМ критеріїв відносно розмірів звичайних лімфоцитів ЛВШ
II етап	<b>n<sub>II</sub>=614</b> 1. Сприятливі імунофенотипи РНПЛ 2. Еталонні групи порівняння	<b>Мета:</b> МФМ та ІГХ дослідження сприятливих імунофенотипів РНПЛ; порівняння їх з відповідними місцевими пухлинами
III етап	<b>n<sub>III</sub>=61</b> Спостереження сприятливих імунофенотипів синдрому РНПЛ	<b>Мета:</b> порівняння ІГХ експресії p16 <sup>INK4</sup> й HER2/neu та ушкоджень відповідних генів CDKN2A й ERBB2 методом FISH

Рисунок 1 – Дизайн дослідження.

Для з'ясування морфометричних (МФМ) параметрів пухлин різного гістогенезу спочатку було проведено ретроспективне дослідження 41 випадку неопластичних уражень ЛВШ без інших клінічних маніфестацій первинної локалізації пухлини. Середній вік пацієнтів склав  $47,68 \pm 16,41$  років (I етап, рис. 1). Окремо були досліджені 10 біоптатів ЛВШ без пухлинного ураження для з'ясування розмірів звичайних лімфоцитів в якості еталону МФМ. Зразки взяті з архіву морфологічного відділу лікувально-діагностичного центру ТОВ «Аптеки медичної академії» (м. Дніпро)

Аналіз клінічних (стать, вік), гістологічних, ІГХ та МФМ характеристик біопсійного / операційного матеріалу пацієнтів з РНПЛ був проведений в порівнянні з відповідними первинними місцево-розповсюджених пухлинами (II етап, рис. 1):

24 спостереження пацієток з ізольованим папілярним канцероматозом (ПК) очеревини, віком від 28 до 81 років (середній вік  $56,29 \pm 14,68$  років) та 46 випадків операційного матеріалу первинних аденокарцином яєчників (АК яєчника) жінок, віком від 27 до 76 років (середній вік  $52,17 \pm 12,72$  років);

з метою з'ясування походження серозних перитонеальних карцином було досліджено матеріал 31 пацієтки від 28 до 76 років (середній вік  $57,32 \pm 11,54$  років), що були розподілені на три групи: 14 маткових труб (МТ) (8 МТ без патологічних змін та 6 з ознаками інтраепітеліальної неоплазії), 13

серозних “high-grade” АК яєчника та 5 ППК серозного фенотипу;

29 пацієток з ураженням ізольованих однобічних аксиллярних лімфатичних вузлів (АЛВ), віком від 32 до 86 років (середній вік  $61,52 \pm 14,42$  років) та 48 випадків операційного матеріалу пацієток з первинною карциномою молочної залози (МЗ), віком від 30 до 89 років (середній вік  $55,43 \pm 12,19$  років);

10 чоловіків з метастазами АК в кістки без первинної локалізації та підвищенням рівня сироваткового маркера PSA, віком від 43 до 57 років (середній вік  $50,00 \pm 9,89$  років) та 21 спостереження операційного матеріалу чоловіків з первинною карциномою передміхурової залози (ПЗ), віком від 56 до 82 років (середній вік  $66,00 \pm 7,76$  років);

37 пацієнтів (29 жінок та 8 чоловіків) з метастазами фенотипу колоректального раку (КРР) [СК 20 (+), CDX-2 (+), СК 7 (-)] без первинної локалізації, віком від 28 до 81 років (середній вік  $58,46 \pm 12,28$  років) та 41 спостереження (24 жінки та 17 чоловіків) операційного матеріалу пацієнтів з первинною колоректальною карциномою, віком від 27 до 76 років (середній вік  $60,56 \pm 12,81$  років);

8 пацієнтів (7 чоловіків та 1 жінка) з екстрагонадними пухлинами із герміногенних клітин (ПГК) (за умови відсутності в анамнезі пухлини гонад), віком від 14 до 37 років (середній вік  $17,50 \pm 8,32$  років) та 16 пацієнтів (6 жінок та 10 чоловіків) із первинним ПГК яєчок / яєчників, віком від 27 до 42 років (середній вік  $35,20 \pm 3,56$  років);

62 зразків ізольованого ураження ЛВШ карциномами без встановленої іншої первинної локалізації (57 чоловіків та 5 жінок), віком від 32 до 53 років (середній вік  $51,95 \pm 12,54$  років) та 58 спостережень ПР відомих локалізацій голови та шиї (29 гортані, 14 ротоглотки, 10 синусів верхньої щелепи, 4 шкіри обличчя, 1 нижньої губи), віком від 38 до 69 років (середній вік  $62,14 \pm 8,87$  років);

11 пацієнтів (7 жінок та 4 чоловіків) з метастазами карцином в ізольовані пахові лімфатичні вузли, віком від 35 до 69 років (середній вік  $52,12 \pm 9,54$  років) та 13 спостережень ПР статевих органів (7 шийки матки у жінок та 4 статевого члена у чоловіків), віком від 43 до 72 років (середній вік  $64,25 \pm 9,32$  років);

107 пацієнтів (42 жінки та 65 чоловіків) з метастазами нейроендокринної пухлини (НЕП) без первинної локалізації віком від 19 до 85 років (середній вік  $58,78 \pm 11,58$  років) та 36 примірників біопсійного матеріалу ТТФ-1 позитивних карцином легенів пацієнтів (10 жінок та 26 чоловіків) віком від 29 до 81 років (середній вік  $58,03 \pm 10,83$  років) для з'ясування відмінностей дуже подібних НЕП легенів, карцином з клітин Меркеля (ККМ) та метастатичних НЕП іншого походження;

6 пацієнтів (4 чоловіка та 2 жінки) з ізольованими метастазами ККМ, віком від 29 до 82 років (середній вік  $63,11 \pm 16,24$  років) та 9 випадків (5 жінок та 4 чоловіків) операційного матеріалу первинних пухлин шкіри ККМ (4

ділянки щік, 3 області стегна, 1 шкіра гомілки та 1 шкіра передпліччя), пацієнтів, віком від 27 до 76 років (середній вік  $52,17 \pm 12,72$  років).

Для проведення FISH дослідження було відібрано біопсійний / операційний матеріал 61 пацієнта (34 жінки та 27 чоловіків) віком від 26 до 74 років (середній вік  $53,4 \pm 11,42$ ) років з верифікованими імунофенотипами клініко-морфологічного синдрому «РНПЛ» на II етапі дослідження: 3 (4,9 %) ПГК екстрагонадного розташування; 6 (9,8 %) ПГК черевної порожнини вірогідно з яєчника (5 серозних АК та 1 муциозна АК); 5 (8,2 %) метастазів АЛВ жінок (3 люмінального типу А та 2 люмінального типу В); 12 (19,7 %) метастазів ПР в ЛВШ; 9 (14,7 %) пахових метастазів ПР; 10 (16,4 %) низькодиференційованих НЕК (G3); 4 (6,5 %) метастази в кістки у чоловіків з підвищенням сироваткового маркера PSA; 9 (14,7 %) метастазів з колоректальним фенотипом [СК 7 (-), СК 20 (+), CDX-2 (+)]; та 3 (4,9 %) карциноми з клітин Меркеля (III етап, рис. 1). Таким чином серед гістологічних форм РНПЛ найчисельнішою виявилась група АК 26 (42,6 %).

*Мікроскопічна діагностика пухлин* виконувалася на світловому мікроскопі Zeiss Primo Star в парафінових зрізах товщиною 4 мкм, виготовлених на мікротомі Microm HM-340 і забарвлених за стандартною методикою гематоксиліном й еозином.

Для *цифрової морфометрії* використовувалась камера мікроскопу Zeiss Primo Star - AxioCam ERC 5s з ліцензованим програмним забезпеченням ZEN 2 blue edition. Сфотографовані поля зору були збережені в форматі .jpg і оброблені в програмі ImageJ з визначенням параметрів периметру, площі та круглості ядер клітин (в залежності від якості зрізів оцінювалось від 15 до 35 ядер клітин для кожного спостереження) за алгоритмом, рекомендованим J. C. Tony, (2007), J. Schindelin et al., (2015), та розрахунком відсотків інтрануклеарних реакцій плагіном ImmunoRatio програми ImageJ (Tuominen V. J. et al., (2010); Konsti J. et al., (2011)).

*Імуногістохімічне дослідження* проводилось згідно протоколів компанії ThermoScientific (TS), (США). Парафінові зрізи завтовшки 4 мкм інформативних блоків наносили на адгезивні предметні скельця SuperFrost Plus. Після депарафінізації та регідратації зрізів проводили епітопне повернення антигенів та пригнічення ендогенної пероксидази. Інкубація зрізів з первинними антитілами проводилась на протязі 30 хвилин у вологих камерах при температурі 23 – 25°C. Використані наступні первинні антитіла: Pan Cytokeratin клон AE1/3 (1:200), Vimentin клон V9 (1:250), CD45 клон Ab-3 (1:200), S100 клон Ab-1 (1:100), HMB45 клон Ab-1 (1:150), CDX-2 клон EPR27649 (1:100), CA-125 клон Ab-1 (1:10), PAX-8 клон MRQ-50 (1:100), Chromogranin A клон sp12 (1:400), Synaptophysin клон sp11 (1:200), Cytokeratin 7 (СК 7) клон RCK105 (1:100), Cytokeratin 20 (СК 20) клон Ks 20.8 (1:100), WT-1 клон Ab-1 (1:500), Calretinin клон sp13 (1:200), ER sp1 (1:400), PGR клон YR85 (1:200), p53 клон Ab-3 (1:100), HER-2/neu клон Ab-1 (1:100), Ki-67 клон sp6 (1:250), PSA клон EP1588Y(1:200), Cytokeratin 8/18 (СК 8/18) клон Ab-2

(K8.8+DC10) (1:100), CK HMW клон Ab-3 (34bE12) (1:50), AR клон RB-9030-PO (1:100), AMACR (p504s) клон 13H4 (1:100),  $\beta$ -катенін клон Ab-1 (1:200), PLAP клон 8A9 (1:80), CD117 клон K45 (RTU), HCG клон CG04 + CG05 (RTU),  $\alpha$ FP Polyclonal Antibody (1:1000), CD30 клон Ber-H2 (1:40), EMA клон E29 (1:800), p63 клон 4A4 (1:400), TTF-1 клон Ab-1 (1:200), p16<sup>INK4A</sup> клон DCS 240 (1:50) (TS, США), а також система візуалізації Lab Vision Quanto з DAB Quanto Chromogen (TS, США).

Оцінювання експресії маркерів першого та другого етапу дослідження проводилось в залежності від типу та локалізації пухлини за рекомендаціями Fletcher C. D. M., (2013); Туффаха М. С. А., Гичка С., Гуски Г., Кристіансен Г., (2018); Dabbs D. J., (2010).

*Флуоресцентна in situ гібридизація (FISH)* виконувалась за протоколом виробника ZytoVision GmbH (Німеччина) на базі морфологічної лабораторії ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України». Зміни в гені ERBB2 оцінювались на предмет ампліфікації гену ДНК-зондом з подвійною міткою для гену та відповідної хромосоми (зонд ZytoDot 2C SPEC ERBB2/CEN 17, ZytoVision GmbH, Німеччина), ген CDKN2A аналізувався на предмет делеції локусу 9p21 ДНК-зондом з подвійною міткою для гену та відповідної хромосоми (зонд ZytoDot 2C SPEC CDKN2A/CEN 9, ZytoVision GmbH, Німеччина). Візуалізацію та кількісну оцінку проводили з допомогою флуоресцентного мікроскопу Axio ImagerA2 (Carl Zeiss, Німеччина). Брали до уваги тільки окремі і добре окреслені клітини. Нашарування клітин з нечіткими сигналами були виключені з аналізу. Кожну пухлину оцінювали на наявність гену p16<sup>INK4A</sup> (CDKN2A) в хромосомі 9 (CEN 9). Гомозиготний тип було визначено, якщо обидва сигнали 9p21 були втрачені.

*Статистичний аналіз* даних проводили в програмному середовищі R version 3.4.1 (2017-06-30) -- "Single Candle" Copyright (C) 2017; The R Foundation for Statistical Computing Platform: x86\_64-w64-mingw32/x64 (64-bit), що поширюється безкоштовно за ліцензією GNU General Public License.

Для порівняння значень показників цифрової морфометрії «площа», «периметр», «коефіцієнт круглості» ядер клітин, а також індексів експресії інтрануклеарних маркерів, розрахованих плагіном ImmunoRatio в програмі ImageJ, спочатку за допомогою критерію Шапіро-Вілка перевірялась відповідність розподілу показника у кожній групі на нормальність. У випадку відмінності розподілу від нормального, для перевірки відмінності середніх значень використовувався непараметричний U-критерій Манна-Уїтні. Для вибірок з нормальним розподілом, для порівняння середніх значень використовували t-критерій Стюдента. Встановлення достовірності міжгрупових зв'язків за кількісним розподілом проводилось за допомогою точного тесту Фішера. Для всіх критеріїв відмінності вважали достовірними при  $p < 0,05$ . Дані представлені як  $M \pm SD$  (середнє значення  $\pm$  стандартне відхилення).

**Результати дослідження та їх обговорення.** Аналіз МФМ

показників пухлин різного гістогенезу дозволив розподілити їх на три групи відносно розмірів звичайних лімфоцитів (ЗЛ): дрібно-, середньо- та великоклітинні пухлини (табл. 1). За отриманими нами результатами карцинома з клітин Меркеля (ККМ), альвеолярна рабдоміосаркома, меланома, неспецифікована периферійна Т-клітинна лімфома, хвороба Кастлемана, низькодиференційовані АК й недиференційовані карциноми, що за морфологією відповідали категорії «дрібно-кругло-синьо-клітинних» пухлин, не відповідали категорії «дійсно дрібноклітинних», а продемонстрували МФМ показники «середньоклітинних» пухлин, але з коефіцієнтом круглості, що близьвся до одиниці (0,75-0,90), подібно до ЗЛ (табл. 1).

Таблиця 1 - Категорії пухлин за морфометричними показниками програми ImageJ, порівняно з звичайними лімфоцитами, мкм<sup>2</sup>, мкм

Категорія пухлин за розміром	Площа ядер клітин (мкм <sup>2</sup> )	Периметр ядер клітин (мкм)	Коефіцієнт круглості ядер клітин
Звичайні лімфоцити ЛВШ (еталон МФМ)	16,74±2,69	15,99±1,54	0,75±0,09
Дійсно дрібноклітинні пухлини	до 30	до 25	різний
Середньоклітинні пухлини	30 - 50	25 - 35	різний
Великоклітинні пухлини	більше 50	більше 35	різний
Дрібно-кругло-синьо-клітинні пухлини	30 - 45	25 - 35	0,75-0,90

Примітка. ЛВШ – лімфатичний вузол шиї, МФМ – морфометричне дослідження.

Розміри «дійсно дрібноклітинних» пухлин серед досліджених непластичних уражень ЛВШ були знайдені в низькодиференційованій АК МЗ, папілярному раці щитоподібної залози, лімфомі із малих лімфоцитів / хронічному лімфолейкозі, лімфомі з клітин маргінальної зони, В-клітинній лімфомі, збагаченій Т-лімфоцитами. «Великоклітинні» пухлини серед [Pan CK AE1/3 (+), Vimentin (-)] пухлин були представлені плоскоклітинними раками (ПР), а серед [Pan CK AE1/3 (-), Vimentin (+)] – класичними варіантами лімфому Ходжкіна. Таким чином, діапазони МФМ показників в програмі ImageJ 30 – 45 мкм<sup>2</sup> за площею, 25 – 35 мкм за периметром та 0,75 – 0,90 за показником круглості, що відповідали категорії «середньоклітинних» пухлин, визначали на етапі планування ІГХ необхідність заміни стандартної первинної панелі маркерів [Pan CK AE1/3, CD 45, Vimentin, S100 i/або НМВ45], на іншу більш розширену і адаптовану саме для «дрібно-кругло-синьо-клітинних» пухлин панель [Pan CK AE1/3, Desmin, CD45, CD56, CD99, S100 i/або НМВ45].

Згідно з класифікацією National Institute for Health and Care Excellence (Australia), за С. М. Vajdic, D. Goldstein, (2015), яка поділяє всі РНПЛ на три групи за категоріями верифікації, після аналізу результатів ІГХ із 41 випадку ізольованого ураження ЛВШ без клінічної маніфестації первинного джерела пухлини (категорія 1 "злоякісні новоутворення невідомого походження") були

визначені наступні групи :

1) «не карциноми» (27 із 41; 65,85 %) з фенотипами [Pan CK AE1/3 (-), Vimentin (+/-) або (+)]: а саме 23 CD 45 (+) лімфоми, 2 S100 і/або HMB45 (+) меланоми, 2 Vimentin (+) саркоми ;

2) карциноми з верифікованим джерелом (5 з 41; 12,19 %) з фенотипом [Pan CK AE1/3 (+), Vimentin (-) або (+/-)]: ПР легенів, світлоклітинний нирково-клітинний рак, папілярний рак щитоподібної залози, протокова карцинома МЗ, АК яєчника;

3) карциноми без відомого джерела (9 з 41; 21,95 %) з фенотипом [Pan CK AE1/3 (+), Vimentin (-) або (+/-)]:

3.1. відносно сприятливі фенотипи синдрому РНПЛ (3 з 41; 7,31 %): 2 метастази ПР в ЛВШ, 1 метастаз ККМ;

3.2. несприятливі фенотипи синдрому РНПЛ (6 з 41; 14,63 %): аденогенні низькодиференційовані карциноми з фенотипами [Pan CK AE1/3 (+), Vimentin (+ або -), СК 7 (+)] та низькодиференційований рак з позитивним тільки Pan CK AE1/3 (+).

За клінічними даними ураження виключно ЛВШ, друга і третя групи карцином разом (14 з 41; 34,15 %) склали 2 категорію «попередні РНПЛ». Але на етапі аналізу органоспецифічних ІГХ маркерів із 14 метастазів тільки у 5 (35,71 %) з'ясували походження, а 9 (64,29 %) залишились без встановленого первинного джерела 3 категорії «встановлені РНПЛ» з патогістологічними діагнозами: метастаз недиференційованого раку, метастаз помірно- або низькодиференційованої АК, метастаз помірно- або низькодиференційованого ПР з негативними реакціями органоспецифічних маркерів, метастаз недиференційованого аденогенного раку, метастаз ККМ. Тільки 3 карциноми (3 з 9; 33,33 %) потрапили до списку «сприятливих імунофенотипів РНПЛ», як ПР, що вражає виключно ЛВШ та метастаз ККМ.

24 спостереження ізольованого папілярного канцероматозу (ІПК) у жінок з ознаками асцити без інших виявлених ділянок пухлинного росту, як фенотип РНПЛ, розподілились на [CA-125 (+), СК 7 (+)] карциноми (15 із 24; 62,5 %), що вірогідно були пов'язані з яєчником та [CA-125 (-), СК 7 (+/-)] пухлини (9 із 24; 37,5 %) інших джерел. Більшість [CA-125 (+), СК 7 (+)] випадків ІПК – (5 із 15; 33,33 %) відповідали серозній ER (+) аденокарциномі (АК) яєчника з імунофенотипом [СК 7 (+), CA-125 (+), СК 20 (-), ER (+), Vimentin (-), WT-1 (+), PAX-8 (+), Calretinin (-)], що за МФМ показниками були більші за площею ядра, ніж первинні серозні АК яєчника (табл. 2).

Інші [CA-125 (+), СК 7 (+)] ІПК розподілились на: (4 з 15; 26,67%) [CA-125 (+), СК 7 (+), СК 20 (+), WT-1 (-), ER (-), PAX-8 (-), CDX-2 (-)] фенотип муцинозної естроген-негативної АК яєчника з середніми МФМ значеннями  $66,7 \pm 4,0$  мкм<sup>2</sup> за площею,  $30,2 \pm 1,9$  мкм за периметром та  $0,75 \pm 0,13$  за показником круглості; (3 з 15; 20,00 %) [CA-125 (+), СК 7 (+), СК 20 (-), WT-1 (-), ER (-), PAX-8 (-), CDX-2 (-)] фенотип неспецифікованої естроген-негативної АК яєчника з середніми МФМ значеннями  $46,1 \pm 14,5$  мкм<sup>2</sup> за

площею,  $26,3 \pm 3,7$  мкм за периметром та  $0,69 \pm 0,09$  за показником круглості; (2 з 15; 13,33 %) [CA-125 (+), CK 7 (+), CK 20 (-), WT-1 (-), ER (+), PAX-8 (+), CDX-2 (-)] фенотип ендометріюїдної естроген-залежної АК яєчника з середніми МФМ значеннями  $32,4 \pm 5,1$  мкм<sup>2</sup> за площею,  $24,7 \pm 2,2$  мкм за периметром та  $0,61 \pm 0,17$  за показником круглості; та (1 з 15; 6,67 %) [CA-125 (+), CK 7 (+), CK 20 (+), WT-1 (-), ER (+), PAX-8 (-), CDX-2 (-)] фенотип муцинозної естроген-залежної АК яєчника з середніми МФМ значеннями  $70,7 \pm 17,3$  мкм<sup>2</sup> за площею,  $32,2 \pm 3,6$  мкм за периметром та  $0,79 \pm 0,14$  за показником круглості.

Таблиця 2 - Показники цифрової морфометрії ядер клітин папілярного канцероматозу серозного фенотипу з яєчника та первинних серозних аденокарцином яєчника в програмі ImageJ, n, мкм<sup>2</sup>, мкм

Типи пухлин	Площа ядер клітин (мкм <sup>2</sup> )	Периметр ядер клітин (мкм)	Коефіцієнт круглості ядер клітин
ППК серозного фенотипу [CK7+, CA-125+, CK20-, ER+, Vimentin-, WT-1+, PAX-8+], (n=5)	$36,1 \pm 8,15$	$22,4 \pm 2,50$	$0,81 \pm 0,13$
Первинні серозні аденокарциноми яєчника, (n=24)	$28,9 \pm 8,09$	$21,2 \pm 2,56$	$0,68 \pm 0,14$
p	<b>p<sup>&amp;</sup> &lt; 0,05</b>	<b>p<sup>&amp;</sup> &gt; 0,05</b>	<b>p* &gt; 0,05</b>

Примітка. n - кількість пухлин, \* - групи порівняні t-критерієм Стьюдента, & - групи були порівняні U-критерієм Манна-Уїтні, ППК – ізольований папілярний канцероматоз.

Еталонами для порівняння даних цифрової морфометрії ППК з яєчників були первинні АКЯ. В таблиці 3 наведено варіанти АКЯ за зменшенням ядер клітин від муцинозного до світлоклітинного варіанту, де найменш круглими виявились ядра ендометріюїдної карциноми.

Таблиця 3 - Показники цифрової морфометрії ядер клітин первинних пухлин яєчників в програмі ImageJ, n, мкм<sup>2</sup>, мкм

Типи первинних пухлин яєчників	Площа ядер клітин (мкм <sup>2</sup> )	Периметр ядер клітин (мкм)	Коефіцієнт круглості ядер клітин
Муциозна АК, (n=3)	$74,29 \pm 19,59$	$33,48 \pm 4,06$	$0,85 \pm 0,12$
Ендометріюїдна АК, (n=4)	$31,50 \pm 5,48$	$22,85 \pm 2,27$	$0,59 \pm 0,12$
Серозна АК, (n=24)	$28,91 \pm 8,09$	$21,26 \pm 2,56$	$0,68 \pm 0,14$
Низькодиференційована АК, (n=13)	$22,75 \pm 4,77$	$18,96 \pm 1,93$	$0,67 \pm 0,09$
Світлоклітинна АК, (n=2)	$20,17 \pm 3,38$	$18,39 \pm 2,12$	$0,63 \pm 0,10$

Примітка. n - кількість пухлин, АК – аденокарцинома.

Третину ППК (9 з 24; 37,5 %) склали варіанти пухлин іншого джерела, а саме КРР (3 з 9; 33,33 %), АК верхніх відділів ШКТ (4 з 9; 44,44 %), мезотеліома (1 з 9; 11,11 %) та НЕК (1 з 9; 11,11 %) (табл. 4). Цифрова морфометрія в програмі ImageJ дозволила виділити з усіх ППК варіанти



подібні за розмірами, які потребують ретельної диференційної діагностики, а саме: муцинозні АКЯ та КРР, неспецифіковані ER (-) АКЯ та АК верхніх відділів ШКТ, серозні АКЯ та мезотеліому. Коефіцієнт круглості тоді дає можливість їх розрізнити: у КРР ядра клітин більш витягнуті та поліморфні, ніж у муцинозних АК; у мезотеліоми мономорфні ядра сплюснені та витягнуті, порівняно з серозними АК, які демонструють кругліші ядра з поліморфізмом (табл. 3, табл. 4). Таким чином доведено, що згідно розподілу варіантів ІПК без первинної локалізації у жінок, як фенотипу РНПЛ, необхідною діагностичною ІГХ панеллю є: [CA-125, CK 7, CK 20, ER, WT-1, PAX-8, CDX-2, Calretinin, Chromogranin A і/або Synaptophysin], а в сумнівних випадках експресії маркерів допоможуть МФМ показники ядер клітин.

Таблиця 4 - Показники цифрової морфометрії ядер клітин ізольованого папілярного канцероматоза фенотипу «не з яєчників» у жінок в програмі ImageJ, n, мкм<sup>2</sup>, мкм

Варіанти ізольованого папілярного канцероматоза	Площа ядер клітин (мкм <sup>2</sup> )	Периметр ядер клітин (мкм)	Коефіцієнт круглості ядер клітин
Фенотип колоректального раку [CA-125-, CK7-, CK20+, WT-1-, ER-, CDX-2+, PAX-8-, Calretinin-], (n=3)	67,8±16,8	33,7±2,9	0,61±0,17
Фенотипи карцином з ШКТ [CA-125-, CK7+, WT-1-, ER-, CK20+/-, CDX-2 +/-, PAX-8-, Calretinin-], (n=4)	39,9±16,7	24,4±4,8	0,72±0,11
Фенотип мезотеліоми [CA-125-, CK7+, CK20-, WT-1+, ER-, PAX-8-, Calretinin+], (n=1)	30,4±3,4	22,2±1,6	0,59±0,09
Фенотип НЕК [CA-125-, CK7+, CK20-, WT-1-, PAX-8-, Calretinin-, Chromogranin A+, Synaptophysin+], (n=1)	18,7±2,1	16,5±1,1	0,84±0,05

Примітка. n - кількість пухлин, ШКТ – шлунково-кишковий тракт, НЕК – нейроендокринна карцинома.

Для дослідження гіпотези про єдине джерело походження «high-grade» серозної АКЯ та серозного ІПК, в якості фенотипу РНПЛ, з ділянок інтраепітеліальної неоплазії маткової труби (ІЕН МТ) було сформовано 3 групи дослідження. Група 1 - зразки МТ (без непластичних трансформацій (1a, ) і ІЕН МТ II-III (16); група 2 – первинні серозні АКЯ; група 3 – ІПК.

Виявлена різниця експресії WT-1 дистальних та проксимальних ділянок МТ за t-критерієм Стьюдента з перевагою відсотку позитивних інтрануклеарних реакцій в дистальних відділах над проксимальними (68,7±8,12% проти 36,8±7,81 % (**p<0,05**)). Але 37,5 % (3 із 8) МТ підгрупи 1a та 33,33 % (2 із 6) МТ підгрупи 16 взагалі мали негативні WT-1 реакції по всій довжині. CA-125 характерний для АКЯ, мав також неоднорідний характер мембранного забарвлення в підгрупах 1a і 16 МТ із зниженням кількості забарвлених клітин в проксимальних фрагментах, інколи до повного зникнення (3 випадки). В групі ІПК кластерне забарвлення CA-125

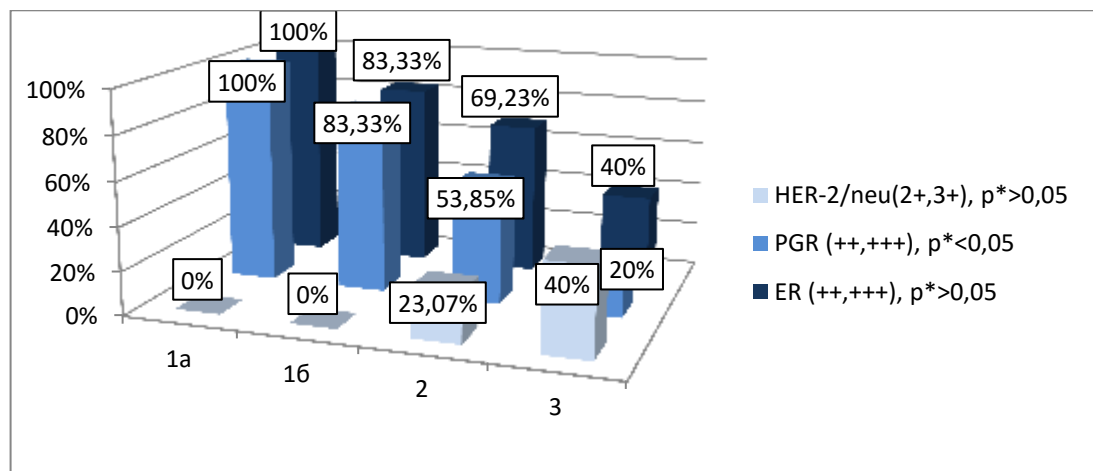
показали папілярні структури 3 випадків, натомість в АКЯ експресія СА-125 носила постійний (+) характер. Дослідження маркеру p53 занесене в табл. 5. За норму брали експресію p53 в підгрупі 1a (МТ без атипії), що коливалась в межах  $7,04 \pm 1,26$  %; аберантну експресію ( $>60$  %, або  $<5$  %) розглядали як мутацію TP53. Точним тестом Фішера різниці знайдено не було ( $p > 0,05$ ).

Таблиця 5 - Показники експресії p53 в спостереженнях епітелію маткової труби без атипії, трубної інтраепітеліальної неоплазії, серозної «high-grade» аденокарциноми яєчника та серозного перитонеального канцероматозу, n, %

Групи дослідження	Експресія p53		
	норма	нижче 5 %	вище 60 %
Група (1a) Епітелій маткової труби без атипії, (n=8)	8	-	-
Група (1б) Трубна інтраепітеліальна неоплазія, (n=6)	-	4 (66,67 %)	2 (33,33 %)
Група (2) Серозна «high-grade» АК яєчника, (n=13)	-	6 (46,15 %)	7 (53,84 %)
Група (3) ШК серозного фенотипу [СА-125+, СК7+, СК20-, WT-1+, PAX-8+, p53+], (n=5)	-	3 (60,00 %)	2 (40,00 %)
p	$p^* > 0,05$		

Примітка. n - кількість пухлин, \* - групи з аберантною експресією p53 були порівняні точним тестом Фішера.

Характеристики гормонального статусу (кількість естрогенових (ER) та прогестеронових (PGR) рецепторів за шкалою McCarty (1985) та експресію епідермального фактору росту HER-2/neu груп 1a, 1б, 2, 3, представлені на рис. 2. Кількісний розподіл був порівняний точним тестом Фішера, знайдена достовірна різниця експресії тільки для PGR ( $p < 0,05$ ) (рис. 2).



Примітка. \* - групи були порівняні точним тестом Фішера.

Рисунок 2 – Експресія маркерів естрогенових (ER), прогестеронових (PGR) рецепторів та HER-2/neu груп епітелію маткової труби без атипії (1a), трубної інтраепітеліальної неоплазії (1б), серозної «high-grade» карциноми яєчника (2) та серозного перитонеального канцероматозу (3), %.

Дослідження спостережень РНПЛ з ураженням ізольованих однобічних

АЛВ у жінок визначило перевагу (22 із 29; 75,86 %) комбінації маркерів [Pan СК AE1/3 (+), СК 7 (+), ER (+/-), PGR (+/-), CA-125 (-), PAX-8 (-), HER-2/neu (+/-)], що відповідає первинним АК МЗ. В інших випадках виявились метастази ПР (2 із 29; 6,89 %), АКЯ (2 із 29; 6,89 %) та НДР (3 із 29; 10,34 %). Порівняння МФМ показників метастазів в АЛВ у жінок з імунофенотипами АК МЗ та первинних АК МЗ продемонструвало подібність за периметром та коефіцієнтом круглості (всі  $p > 0,05$ ). Але площі клітин метастазів МЗ в АЛВ були достовірно меншими ( $p < 0,05$ ) за U-критерієм Манна-Уїтні, через що карциноми набували недиференційованого вигляду (табл. 6).

Таблиця 6 - Показники цифрової морфометрії ядер клітин метастазів аксиллярних лімфатичних вузлів з фенотипами карцином молочної залози та первинних карцином молочної залози, n, мкм<sup>2</sup>, мкм

Групи дослідження	Площа ядер клітин (мкм <sup>2</sup> )	Периметр ядер клітин (мкм)	Коефіцієнт круглості ядер клітин
Метастази АЛВ у жінок з фенотипами карцином МЗ [Pan СК AE1/3(+), СК7(+), ER(+/-), PGR (+/-), CA-125(-), PAX-8(-), HER-2/neu (+/-)], (n=22)	30,9±11,0	22,2±3,9	0,64±0,13
Первинні карциноми молочної залози, (n=48)	41,1±9,6	25,5±2,9	0,70±0,12
p	$p^{\&} < 0,05$	$p^* > 0,05$	$p^* > 0,05$

Примітка. n - кількість пухлин, \* - групи були порівняні t-критерієм Стьюдента, & - групи були порівняні U-критерієм Манна-Уїтні, МЗ – молочна залоза, АЛВ – аксиллярні лімфатичні вузли.

Розподіл за комбінаціями прогностичних маркерів [ER, PGR, HER-2/neu] «золотого стандарту» діагностики раку МЗ згідно точного тесту Фішера показав статистично достовірну різницю між групами ( $p < 0,05$ ) в бік збільшення три-негативних зразків [ER-, PGR-, HER-2/neu-] в групі РНПЛ. Порівняння вікових діапазонів групи жінок з метастазами в АЛВ карцином фенотипів МЗ та групи первинних карцином МЗ (66,23±11,09 проти 55,43±12,19 років) t-критерієм Стьюдента показало достовірну різницю ( $p < 0,05$ ).

Цифрова морфометрія спостережень РНПЛ у чоловіків з метастазами в кістки і підвищеним рівнем сироваткового PSA виявила достовірне зменшення показників площі та периметру ядер клітин (всі  $p < 0,05$ ), порівняно з первинними карциномами ПЗ (табл. 7).

Дослідження віку цих груп (50,00±9,89 проти 66,00±7,76 років) t-критерієм Стьюдента визначило достовірно більш молодий вік в групі метастатичних карцином ( $p < 0,05$ ).

Патогістологічне дослідження ступеня диференціювання метастазів карцином в кістки у чоловіків із підвищенням PSA виявило 7 з 10 (70,00 %) АК низькодиференційованої будови та 3 з 10 (30,00 %) НДР, порівняно з первинними карциномами ПЗ, де 12 з 21 (57,14 %) були ацинарними АК

помірного ступеня диференціювання, 8 з 21 (38,09 %) – низькодиференційованими АК, і 1 з 21 (4,76 %) – НДР, за точним тестом Фішера знайдено достовірну різницю (**p<0,05**). При порівнянні експресії андрогенових рецепторів (AR) за напівкількісною шкалою, в обох групах отримана достовірна різниця за точним тестом Фішера (**p<0,05**) з перевагою AR (-) негативних спостережень серед метастатичних карцином.

Таблиця 7. Показники цифрової морфометрії ядер клітин метастазів кісток чоловіків з підвищенням сироваткового PSA та первинних карцином передміхурової залози в програмі ImageJ, n, мкм<sup>2</sup>, мкм

Групи дослідження	Площа ядер клітин (мкм <sup>2</sup> )	Периметр ядер клітин (мкм)	Коефіцієнт круглості ядер клітин
Метастази кісток з підвищенням сироваткового PSA, (n=10)	16,3 ± 3,4	16,0 ± 2,1	0,67 ± 0,15
Первинні карциноми передміхурової залози, (n=21)	49,8 ± 9,9	27,5 ± 2,9	0,77 ± 0,12
p	<b>p<sup>&amp;</sup>&lt;0,05</b>	<b>p*<sup>&amp;</sup>&lt;0,05</b>	p* <sup>&amp;</sup> >0,05

Примітка. n - кількість пухлин, \* - групи порівняні t-критерієм Стьюдента, & - групи порівняні U-критерієм Манна-Уїтні

Дослідження ділянок з метастазами АК колоректального профілю [СК 20 (+), CDX-2 (+), СК 7 (-)] у жінок показало їх переважну локалізацію (18 з 37; 48,65 %) в органах репродуктивної системи: 13 з яких (35,13 %) знайшли в яєчниках, а 5 - в інших локалізаціях (шийка, тіло матки, піхва). Вік жінок з первинними КРР (середній вік 60,54±12,25 років) був старшим за жінок з метастазами в органах репродуктивної системи (середній вік 59,26±13,40 років) і жінок з метастазами КРР інших ділянок (середній вік 57,2±12,16 років), але достовірної відмінності t-критерієм Стьюдента виявлено не було (всі p>0,05). Порівняння даних цифрової морфометрії метастатичних та первинних АК колоректального профілю продемонструвало подібність за показниками площі та периметру (p>0,05) (табл. 8).

Таблиця 8 - Показники цифрової морфометрії ядер клітин метастатичних та первинних карцином колоректального профілю в програмі ImageJ, M±SD, мкм<sup>2</sup>, мкм

Групи дослідження	Площа ядер клітин (мкм <sup>2</sup> )	Периметр ядер клітин (мкм)	Коефіцієнт круглості ядер клітин
Метастатичні карциноми колоректального фенотипу [СК 20 (+), CDX-2 (+), СК 7 (-)], (n=37)	42,9±13,6	26,2±3,7	0,63±0,10
Первинні карциноми товстої кишки, (n=41)	38,8±12,3	23,9±3,7	0,74±0,08
p	p* <sup>&amp;</sup> >0,05	p* <sup>&amp;</sup> >0,05	<b>p*<sup>&amp;</sup>&lt;0,05</b>

Примітка. n - кількість пухлин, \* - групи порівняні t-критерієм Стьюдента.

Згідно точного тесту Фішера «фокальна» (+) експресія p53, ядерна транлокація β-катеніна (>30 %) та надекспресія АМАСР (++,+++) виявились достовірно частіше в метастатичних КРР, порівняно із первинними КРР (всі  $p < 0,05$ , відповідно) (табл. 9).

Таблиця 9 - Розподіл експресії прогностичних маркерів в групах метастатичних та первинних аденокарцином колоректального профілю, n

Група дослідження	p53		Ki-67		β-катенін		АМАСР		HER-2/neu	
	(-)	(+) фокальна	10 % - 25 %	більше 25 %	(-), (я) < 30 %	(я) > 30 %	0, + (слабка)	++ (помірна), +++ (сильна)	0 і 1+	2+ і 3+
Метастатичні КРР, (n=37)	16	21	11	26	18	19	12	25	24	13
Первинні КРР, (n=41)	32	9	14	27	36	5	31	10	35	6
p*	<b>p&lt;0,05</b>		p>0,05		<b>p&lt;0,05</b>		<b>p&lt;0,05</b>		p>0,05	

Примітка. n - кількість пухлин, \* - групи порівняні точним тестом Фішера, статистично достовірна різниця вважалась при  $p < 0,05$ , КРР – колоректальний рак.

Позитивний статус HER-2/neu (градації 2+ і 3+) пухлини достовірно частіше визначався у чоловіків з метастатичним КРР, порівняно з жінками (6 з 8; 75,0 % проти 7 з 29; 24,1 %;  $p < 0,05$ ) та підвищувався з падінням ступеня диференціювання (1 з 9, 11,1 % для G1; 8 з 23, 34,8 % для G2; 4 з 5, 80,0 % для G3;  $p < 0,05$ ). Серед жінок, порівняно з чоловіками, виявилось більше метастазів КРР з високим ІІ за експресією Ki-67 (23 з 29; 79,3 % проти 3 з 8; 37,5%;  $p < 0,05$ ).

Мінливість гістологічної картини змішаних варіантів пухлин з герміногенних клітин (ПГК) і вірогідність їх екстрагонадного розташування визначає ІГХ ключовим інструментом у діагностиці низькодиференційованих карцином з розподілом по середній лінії тіла (екстрагональний зародково-клітинний синдром), як фенотипу РНПЛ. Маркери PLAP і CD117 показали найбільшу експресію в герміномах/семіномах, їх МФМ значення більше ніж в три рази за площею і два рази за периметром перевищували еталон МФМ ЗЛ ( $p_{пл} < 0,05$ ,  $p_{пр} < 0,05$ ) (табл. 10). Експресія CD30, ЕМА і СК Рап АЕ1/АЕ3 виявилась діагностично значущою в ембріональній карциномі, МФМ показники в середньому в 2,1 рази за площею та в 1,7 за периметром перевищували ЗЛ ( $p_{пл} < 0,05$ ,  $p_{пр} < 0,05$ ) (табл. 10). αFP позитивний статус визначався в пухлинах жовткового мішка, в яких МФМ показники більше ніж в середньому в 1,7 рази за площею та в 1,5 за периметром перевищували аналогічні параметри ЗЛ ( $p_{пл} < 0,05$ ,  $p_{пр} < 0,05$ ) (табл. 10).

Для отримання точних диференційно-діагностичних критеріїв МФМ дослідження ядер пухлин були проведені в типових варіантах пухлин з

герміногенних клітин (змішані варіанти були виключені). Найбільші розміри ядер пухлинних клітин визначені в семіномі обох груп, найменші – в пухлині з жовткового мішка (табл. 10).

Таблиця 10 - Показники цифрової морфометрії ядер клітин груп дослідження пухлин з герміногенних клітин в програмі ImageJ, n, мкм<sup>2</sup>, мкм

Типи пухлин	Група	Площа ядер клітин (мкм <sup>2</sup> )	Периметр ядер клітин (мкм)	Коефіцієнт круглості ядер клітин	p <sub>1</sub> - різниця між ЕПГК та ПГК
Семінома (1)	ЕПГК, (n=4)	47,6±4,04	31,8±1,32	0,80±0,12	p <sub>пл</sub> >0,05, p <sub>пр</sub> >0,05, p <sub>кк</sub> >0,05
	ПГК, (n=6)	48,4±4,86	30,2±2,98	0,78±0,07	
Ембріональна карцинома (2)	ЕПГК, (n=2)	34,4±2,05	26,5±2,32	0,74±0,15	p <sub>пл</sub> >0,05, p <sub>пр</sub> >0,05, p <sub>кк</sub> >0,05
	ПГК, (n=5)	31,4±2,72	25,2±2,35	0,75±0,12	
Пухлина жовткового мішку (3)	ЕПГК, (n=1)	29,8±2,41	24,2±1,53	0,72±0,13	p <sub>пл</sub> >0,05, p <sub>пр</sub> >0,05, p <sub>кк</sub> >0,05
	ПГК, (n=2)	28,4±3,84	23,7±2,43	0,73±0,13	
Еталон МФМ (звичайні лімфоцити)		16,7±2,69	15,9±1,54	0,75±0,09	
p <sub>2</sub> - різниця між ЕПГК та звичайними лімфоцитами		p <sub>(1)</sub> &<0,05, p <sub>(2)</sub> &<0,05, p <sub>(3)</sub> &<0,05	p <sub>(1)</sub> &<0,05, p <sub>(2)</sub> &<0,05, p <sub>(3)</sub> &<0,05	p <sub>(1)</sub> *>0,05, p <sub>(2)</sub> *>0,05, p <sub>(3)</sub> *>0,05	

Примітка. n - кількість пухлин, \* - групи порівняні t-критерієм Стьюдента, & - групи порівняні U-критерієм Манна-Уїтні, p<sub>пл</sub> – за площею, p<sub>пр</sub> – за периметром, p<sub>кк</sub> – за коефіцієнтом круглості, ЕПГК - екстрагонадні пухлини з герміногенних клітин, ПГК - пухлини з герміногенних клітин.

Серед 62 пацієнтів з анонімними метастазами карцином в ЛВШ у 35 осіб (56,45 %) (12 жінок і 23 чоловіків) було визначено ПР з фенотипом [Pан СК AE1/3 (+), СК HMW (+), p63 (+), TTF-1 (-), p16<sup>INK4A</sup> (+/-)]. Вік хворих (середній вік 51,26±10,23 років) за t-критерієм Стьюдента достовірно не відрізнявся від віку групи порівняння ПР голови і шиї відомих локалізацій (середній вік 62,14±8,87 років), p>0,05.

За результатами цифрової морфометрії ядра пухлинних клітин метастазів ПР в ЛВШ були достовірно меншими за площею й периметром (p<0,05) та більш витягнуті та поліморфні (p<0,05), в порівнянні з ядрами клітин первинного ПР голови та шиї, що відповідало низькодиференційованим формам ПР, які серед метастатичних ПР займали 45,71 % (16 з 35) (табл. 11).

Окрему характеристику заслуговує маркер p16<sup>INK4A</sup>, що був негативним в ПР гортані, шкіри обличчя та нижньої губи (інтрануклеарні реакції поодиноких клітин) та (+) (змішана ядерно-цитоплазматична реакція скупчень «блоків» клітин) в 57,14 % (8 з 14) ПР ротоглотки та в 40,00 % (4 з 10) ПР верхньощелепної пазухи. p16<sup>INK4A</sup> позитивні клітини були знайдені тільки 8,57 % (3 з 35) p16<sup>INK4A</sup> (+) спостережень (2 жінки і 1 чоловік), що дало

можливість припустити походження цих ПР з ротоглотки або з пазухи верхньої щелепи.

Таблиця 11 - Показники цифрової морфометрії ядер клітин метастазів плоскоклітинних раків в лімфатичні вузли ший без відомого джерела та первинних плоскоклітинних раків голови та ший, n, мкм<sup>2</sup>, мкм

Група дослідження	Площа ядер клітин (мкм <sup>2</sup> )	Периметр ядер клітин (мкм)	Коефіцієнт круглості ядер клітин
Метастази ПР в ЛВШ, (n=35)	62,7±17,73	32,9±6,01	0,69±0,13
Первинні ПР голови та ший, (n=48)	75,5±27,77	44,1±11,12	0,78±0,05
p*	<b>p* &lt; 0,05</b>	<b>p* &lt; 0,05</b>	<b>p* &lt; 0,05</b>

Примітка. n - кількість пухлин, \* - групи порівняні t-критерієм Стьюдента, ПР – плоскоклітинний рак, ЛВШ – лімфатичні вузли ший.

При ІГХ аналізі анонімних метастазів в пахові лімфатичні вузли (ПЛВ) у 11 осіб (у 7 жінок (середній вік 64,17±11,41 років) та у 4 чоловіків (середній вік 59,75±11,32 років)) метастази імунофенотипу [Pан СК АЕ1/3 (+), СК НМВ (+), р63 (+), ТТФ-1 (-), p16<sup>INK4A</sup> (+)/(-)] були виявлені у 4 з 7 (57,14 %) жінок й у 1 з 4 (25,00 %) чоловіків. Ядра пухлинних клітин метастазів мали достовірно менші параметри площі і периметру та подібні коефіцієнти круглості, порівняно із первинним ПР шийки матки у жінок і статевих органів у чоловіків відповідно (табл. 12). У 6 з 7 (85,71 %) жінок метастази карцином в ПЛВ були p16<sup>INK4A</sup> позитивними, що підкреслює корисність цього маркера в діагностиці метастазів «попередніх РНПЛ» з жіночої репродуктивної системи.

Таблиця 12 - Показники цифрової морфометрії ядер клітин метастазів плоскоклітинного раку пахових лімфатичних вузлів та первинних плоскоклітинних раків статевих органів, n, мкм<sup>2</sup>, мкм

Групи порівняння	Площа ядер клітин (мкм <sup>2</sup> )	Периметр ядер клітин (мкм)	Коефіцієнт круглості ядер клітин
Метастази ПР в ПЛВ у жінок, (n=4)	55,5±9,93	29,7±3,42	0,79±0,05
Первинний ПР шийки матки, (n=7)	74,8±12,33	42,4±11,82	0,71±0,03
p	<b>p<sup>&amp;</sup> &lt; 0,05</b>	<b>p<sup>&amp;</sup> &lt; 0,05</b>	p <sup>&amp;</sup> > 0,05
Метастази ПР в ПЛВ у чоловіків, (n=1)	62,3±8,38	30,6±3,71	0,73±0,04
Первинний ПР статевих органів, (n=6)	75,3±11,70	40,9±10,11	0,72±0,05
p	<b>p<sup>&amp;</sup> &lt; 0,05</b>	<b>p<sup>&amp;</sup> &lt; 0,05</b>	p <sup>&amp;</sup> > 0,05

Примітка. n - кількість пухлин, & - групи порівняні U-критерієм Манна-Уїтні, ПР – плоскоклітинний рак, ПЛВ – пахові лімфатичні вузли.

За результатами ІГХ досліджень 107 випадків метастазів нейроендокринних пухлин (НЕП) невідомого походження через позитивні реакції з органоспецифічними маркерами були розподілені на 5 груп: метастази НЕП з легенів (37 з 107; 34,58 %), метастази НЕП з товстої кишки

(8 з 107; 7,5 %), метастази НЕП з молочної залози (6 з 107; 5,6 %) та метастази ККМ (6 з 107; 5,60 %). При співпадінні локалізації і ІГХ профілю пухлини розцінювались як первинні: 35,13 % (13 з 37) - в ділянці легенів, 50,00 % (4 з 8) - товстої кишки, 33,33 % (2 з 6) - молочної залози. З групи НЕП без позитивних органоспецифічних реакцій (50 з 107; 46,73%) відокремилась група низькодиференційованих (G3) НЕК (31 з 50; 62,00 %), як фенотип РНПЛ, що мали достовірно більший ІІ за t-критерієм Стьюдента ніж НЕП з G1 та G2 ( $35,4 \pm 17,35$  проти  $13,0 \pm 0,72$ ;  $p < 0,05$ ).

Порівняння за U-критерієм Манна-Уїтні даних цифрової морфометрії ІІ метастатичних НЕК (G3) без органоспецифічних ознак з дрібноклітинними НЕК (G3) легенів знайшло достовірну різницю площі ядер клітин ( $p < 0,05$ ) та проліферативної активності за Ki-67 ( $p < 0,05$ ). Натомість в метастазах НЕК (G3) з імунофенотипом [Pan CK AE1/3 (+), Vimentin (-), Chromogranin A (+/-) і/або Synaptophysin (+/-) і/або CD56 (+), CK 20 (-), CK 7 (+), TTF-1 (+)] й вірогідним походженням з легенів такої різниці не виявлено (всі  $p > 0,05$ ) (табл. 13).

Таблиця 13 - Показники цифрової морфометрії та проліферативної активності ядер клітин нейроендокринних карцином G3 без відомої первинної локалізації та первинних дрібноклітинних карцином легенів в програмі ImageJ, n, мкм<sup>2</sup>, мкм, %

Групи порівняння	Площа ядер клітин (мкм <sup>2</sup> )	Периметр ядер клітин (мкм)	Коефіцієнт круглості ядер клітин	ІІ за Ki-67, %
Метастатичні НЕК (G3) без органоспецифічних ознак, як імунофенотип клініко-морфологічного синдрому РНПЛ (1), (n=31)	35,0±6,81	24,9±2,34	0,71±0,82	35,4±17,35
Метастатичні НЕК (G3) легенів [CK7(+), TTF-1(+)] (2), (n=31)	25,3±4,99	18,9±1,89	0,74±0,08	56,6±18,13
Первинні дрібноклітинні НЕК (G3) легенів, (n=17)	21,5±5,15	18,5±2,08	0,72±0,05	49,1±14,60
p*	p(1) <sup>&amp;</sup> <0,05 p(2) <sup>&amp;</sup> >0,05	p(1) <sup>&amp;</sup> >0,05 p(2) <sup>&amp;</sup> >0,05	p(1) <sup>&amp;</sup> >0,05 p(2) <sup>&amp;</sup> >0,05	p(1) <sup>&amp;</sup> <0,05 p(2) <sup>&amp;</sup> >0,05

Примітка. n - кількість пухлин, & - групи порівняні U-критерієм Манна-Уїтні, \* - порівняння групи (1) та групи (2) проводили з первинними дрібноклітинними НЕК легенів, ІІ – індекс проліферації, НЕК – нейроендокринна карцинома, РНПЛ – рак невідомої первинної локалізації.

При дослідженні метастатичних та первинних ККМ, з'ясувалось, що РНПЛ може бути трактований як метастаз ККМ, якщо він демонструє фенотип [Pan CK AE1/3 (парануклеарно +), CK 20 (парануклеарно +), Vimentin (-), CD45 (-), HMV45 (-), Chromogranin A (+), Synaptophysin (+)], а розміри ядер пухлинних клітин відповідають категорії дрібно-кругло-синьо-клітинних пухлин (табл. 14).



Таблиця 14 - Показники цифрової морфометрії ядер клітин первинних та метастазів карцином з клітин Меркеля в програмі ImageJ, n, мкм<sup>2</sup>, мкм, %

Група дослідження	Площа ядер клітин (мкм <sup>2</sup> )	Периметр ядер клітин (мкм)	Коефіцієнт круглості ядер клітин
Первинні ККМ (1), (n=9)	37,26±5,69	25,07±1,52	0,79±0,04
Метастази ККМ (2), (n=6)	35,86±5,93	25,45±2,09	0,80±0,06
Еталон МФМ (звичайні лімфоцити)*	16,74±2,69	15,99±1,54	0,75±0,09
p	p <sup>&amp;</sup> >0,05, p*(1) &<0,05, p*(2) &<0,05	p <sup>&amp;</sup> >0,05, p*(1) &<0,05, p*(2) &<0,05	p <sup>&amp;</sup> >0,05, p*(1) &>0,05, p*(2) &>0,05

Примітка. n - кількість пухлин, & - групи порівняні U-критерієм Манна-Уїтні, \* - порівняння 1 і 2 груп карцином проводили з розмірами звичайних лімфоцитів, ККМ - карцинома з клітин Меркеля, МФМ - морфометричне дослідження.

З 61 випадку РНПЛ, ядерно-цитоплазматична експресія p16<sup>INK4A</sup> виявилась у 31 з 61 (50,8 %) хворих, які на FISH дослідженні підтвердились лише в 28 спостереженнях – 9 гомозиготних та 19 гетерозиготних делецій 9p21 (у всіх фенотипах РНПЛ крім екстрагонодного зародкового синдрому). Експресія HER-2/neu на рівні (2+/3+) виявилась в 15 з 61 (24,6 %) РНПЛ, але тільки в 9 з 61 (14,7 %) мала місце дійсна ампліфікація гена ERBB2 на FISH в п'яти фенотипах - екстрагонадний зародковий синдром; жінки з ІПК; жінки з ізольованими метастазами АК в АЛВ; НЕК G3 (які мали походження з МЗ) та АК з профілем товстої кишки [СК 7 (-), СК 20 (+), CDX-2 (+)]. Невелика кількість фенотипів метастатичних карцином з ампліфікацією гену ERBB2 визначає його більшу специфічність для FISH диференційної діагностики РНПЛ, порівняно із делецією 9p21 (p16<sup>INK4A</sup> / CDKN2A), яка вірогідно є універсальною для набуття інвазивного та дисемінованного перебігу карцином різних локалізацій.

## ВИСНОВКИ

Актуальною задачею залишається встановлення джерела походження анонімних метастазів низькодиференційованих аденокарцином та недиференційованих раків, що об'єднують в клініко-морфологічний синдром «Рак невідомої первинної локалізації». Складність верифікації недиференційованих (анапластичних) пухлин обумовлена втратою специфічної морфології та імуногістохімічного профілю. У дисертаційній роботі вирішується важливе клініко-морфологічне завдання щодо удосконалення алгоритмів імуногістохімічної діагностики недиференційованих (анапластичних) пухлин та пухлин без встановленої первинної локалізації за допомогою цифрової морфометрії та FISH.

1. В діагностиці недиференційованих (анапластичних) пухлин та пухлин без відомого первинного джерела доцільно виконувати цифрове морфометричне дослідження з метою відокремлення категорії дрібно-кругло-сильно-клітинних пухлин (30 - 45 мкм<sup>2</sup> за площею, 25 – 35 мкм за периметром,

0,75-0,90 за коефіцієнтом круглості) й отримання об'єктивних підстав заміни стандартної первинної імуногістохімічної панелі з [Pan CK AE1/3, CD45, Vimintin, S100 i/або НМВ45] на розширену і адаптовану панель для дрібно-кругло-синьо-клітинних пухлин [Pan CK AE1/3, Desmin, CD45, CD56, CD99, S100 i/або НМВ45]. Кількість спостережень метастатичних уражень 3 категорії «підтверджений рак невідомої первинної локалізації» значно перевищує показники світової статистики (21,95 % проти 3-5 %), внаслідок неповного обстеження пацієнтів на «до-біопсійному етапі».

2. Розподіл спостережень ізольованого папілярного канцероматозу у жінок продемонстрував більшість (15 із 24; 62,5 %) [CA-125 (+), СК 7(+)] варіантів метастазів карцином яєчників з перевагою (5 із 15; 33,33 %) фенотипу серозної ER (+) аденокарциноми, що за показником площі ядер клітин мала достовірно крупніші ядра ( $p < 0,05$ ), порівняно з первинними серозними аденокарциномами яєчників. Варіанти [CA-125 (-), СК 7(-/+)] канцероматозів (9 з 24; 37,5 %) виявились колоректальним раком (3 з 9; 33,33 %), карциномами верхніх відділів шлунково-кишкового тракту (4 з 9; 44,44 %), мезотеліомою (1 з 9; 11,11 %) та нейроендокринною карциномою (1 з 9; 11,11 %), що обумовлює для цієї локалізації використання вторинної панелі маркерів у складі [CA-125, СК 7, СК 20, ER, WT-1, PAX-8, CDX-2, Calretinin, Chromogranin A i/або Synaptophysin].

3. Серозний папілярний канцероматоз у жінок з фенотипом [CA-125 (+), СК 7 (+), СК 20 (-), ER (+/-), WT-1 (+), PAX-8 (+)], серозна аденокарцинома яєчника «high-grade» варіант та інтраепітеліальна неоплазія маткової труби продемонстрували подібну аберантну експресію онкопротеїну p53 ( $p > 0,05$  за точним тестом Фішера) та схожий до дистальних фрагментів маткових труб імуногістохімічний профіль: СК 7 - строго (+), СК 20 - строго (-), зниження CA-125 мембранного забарвлення в проксимальних фрагментах маткових труб, перевага WT-1 позитивної реакції в дистальних відділах маткових труб над проксимальними ( $68,7 \pm 8,12$  % проти  $36,8 \pm 7,81$  %;  $p < 0,05$ ). Серозний папілярний канцероматоз у жінок характеризувався втратою експресії ER й PGR, та надекспресією HER-2/neu, порівняно з серозною аденокарциномою яєчників й інтраепітеліальною неоплазією маткової труби, але різниця була знайдена тільки для PGR ( $p < 0,05$ ).

4. Серед анонімних метастазів в аксиллярні лімфатичні вузли у жінок значну перевагу (22 із 29; 75,86 %) мали [Pan CK AE1/3 (+), СК 7 (+), CA-125 (-), PAX-8 (-), ER (+/-) / PGR (+/-) / HER-2/neu (+/-)] фенотипи карцином, подібні до первинних карцином молочної залози за морфологічною будовою, показниками периметру та круглості ядер клітин ( $p > 0,05$ ), але достовірно меншими площами ядер клітин ( $p < 0,05$ ). Порівняння груп метастатичних та первинних карцином молочної залози показало достовірну різницю за віком жінок ( $66,23 \pm 11,09$  проти  $55,43 \pm 12,19$  відповідно,  $p < 0,05$ ) та розподілом комбінацій маркерів ER, PGR, HER-2/neu, із перевагою три-негативних варіантів [ER (-), PGR (-), HER-2/neu (-)] в метастатичних карциномах

( $p < 0,05$ ).

5. За даними цифрової морфометрії спостереження метастазів кісток у чоловіків з підвищенням рівня сироваткового PSA продемонстрували достовірне зменшення показників площі та периметру ядер клітин ( $p < 0,05$ ), порівняно з первинними карциномами передміхурової залози. Достовірну різницю в цих групах було знайдено за віком чоловіків ( $50,00 \pm 9,89$  проти  $66,00 \pm 7,76$ , більш молодий вік в групі метастазів кісток), ( $p < 0,05$ ); за розподілом ступенів диференціювання (G3 70,00 % проти 38,09 %, більше низькодиференційованих аденокарцином в групі метастазів кісток), ( $p < 0,05$ ) та за експресією AR в бік зменшення кількості AR (+) позитивних карцином в групі метастазів кісток ( $p < 0,05$ ).

6. В групі метастазів карцином колоректального профілю [СК 20 (+), CDX-2 (+), СК 7 (-)] у жінок переважали метастази в яєчники (13 з 37; 35,13 % випадків). З огляду на подібність первинних муцинозних карцином яєчників до колоректальних карцином, для їх диференційної імуногістохімічної діагностики необхідне застосування розширеної панелі з маркерами виключення [CA-125, СК 7, ER, WT-1, PAX-8, p16<sup>INK4A</sup>]. Фокальна позитивна експресія p53, ядерна транлокація  $\beta$ -катеніна ( $>30\%$ ) та надекспресія AMACR виявились достовірно частіше в метастазах карцином колоректального профілю, порівняно із первинними колоректальними раками (всі  $p < 0,05$ ). В групі метастазів колоректального профілю позитивний статус HER-2/neu (градації 2+ і 3+) достовірно частіше визначався у чоловіків, порівняно з жінками ( $p < 0,05$ ) та підвищувався з падінням ступеня диференціювання пухлини ( $p < 0,05$ ). Метастази колоректального профілю з високим індексом Ki-67 достовірно частіше виявлялись серед жінок ( $p < 0,05$ ).

7. Позитивна експресія маркерів Pan СК AE1/3, CD30 і EMA виявилась діагностично значущою у ембріональних карциномах гонад та ембріональних карциномах екстрагонадної локалізації, в яких, за даними цифрової морфометрії, площа ядер пухлинних клітин більше ніж в три рази перевищувала площу ядер звичайних лімфоцитів ( $p < 0,05$ ). На відміну від ембріональних карцином, герміноми / семіноми показали найбільшу експресію маркерів PLAP і CD117 та втричі більші за звичайні лімфоцити ядра клітин (найбільші з усіх пухлин з герміногенних клітин), а пухлини жовткового мішка демонстрували позитивний статус за  $\alpha$ FP та найменші ядра клітин.

8. Серед 62 осіб з анонімними метастазами карциноми в лімфатичні вузли ший у 35 (56,45 %) хворих були визначені метастази плоскоклітинного раку з фенотипом [Pan СК AE1/3 (+), СК HMW (+), p63 (+), TTF-1 (-), p16<sup>INK4A</sup> (+/-)], подібним до первинної плоскоклітинної карциноми голови і ший. За результатами цифрової морфометрії, ядра клітин метастазів плоскоклітинного раку, порівняно з первинними пухлинами, достовірно були менших розмірів за площею й периметром, більш витягнуті та поліморфні (всі  $p < 0,05$ ), що відповідало низькодиференційованим гістологічним формам,

які серед метастатичних плоскоклітинних раків займали 45,71 % (16 з 35). Позитивна експресія p16<sup>INK4A</sup> відзначилась тільки в двох з п'яти первинних локалізацій плоскоклітинного раку: в 8 з 14 (57,14 %) ротоглотки та в 4 з 10 (40,00 %) верхньощелепної пазухи. Серед анонімних метастазів плоскоклітинного раку в лімфатичні вузли шиї 8,57 % (3 з 35) спостережень мали позитивний статус за p16<sup>INK4A</sup>, що робило вірогідним їх походження з ротоглотки або пазухи верхньої щелепи.

9. Серед осіб з анонімними метастазами карциноми в пахові лімфатичні вузли у 4 з 7 (57,14 %) жінок та у 1 з 4 (25,00 %) чоловіків були виявлені метастази плоскоклітинного раку з фенотипом [Pan CK AE1/3 (+), CK HMW (+), p63 (+), TTF-1 (-), p16<sup>INK4A</sup> (+)/(-)], що продемонстрували достовірно менші значення показників площі та периметру ядер клітин, порівняно із первинним ПР шийки матки у жінок і ПР статевих органів у чоловіків (всі  $p < 0,05$ ). У 6 з 7 (85,71 %) жінок метастази карциноми в пахові лімфатичні вузли мали p16<sup>INK4A</sup> позитивний статус і відношення до репродуктивної системи, що свідчить про доцільність використання p16<sup>INK4A</sup> в діагностиці метастазів в пахові лімфатичні вузли.

10. За даними цифрової морфометрії метастатичні нейроендокринні карциноми (G3) без позитивних органоспецифічних маркерів мали достовірно більші розміри площі ядер клітин ( $p < 0,05$ ) та менший індекс проліферації за Ki-67 ( $p < 0,05$ ), порівняно з первинними дрібноклітинними карциномами легенів (G3). Натомість в анонімних метастазах нейроендокринних карцином (G3) з імунофенотипом [Pan CK AE1/3 (+), Vimentin (-), Chromogranin A (+/-) і/або Synaptophysin (+/-) і/або CD56 (+), CK 20 (-), CK 7 (+), TTF-1 (+) - вірогідним походженням з легенів] різниці з первинними дрібноклітинними карциномами легенів (G3) виявлено не було (всі  $p > 0,05$ ). Карциноми без первинної локалізації можуть вважатися метастазами карциноми з клітин Меркеля, якщо вони мають фенотип [Pan CK AE1/3 (парануклеарно +) / CK 20 (парануклеарно +) / Vimentin (-) / CD45 (-) / S100 (-) / Chromogranin A (+) / Synaptophysin (+), TTF-1 (-)] та розміри ядер, що відповідають категорії дрібно-кругло-синьо-клітинних пухлин.

11. Позитивна експресія p16<sup>INK4A</sup> була виявлена імуногістохімічним методом у 31 із 61 (51,4 %) спостережень раку невідомої первинної локалізації, що було підтверджено тільки в 28 з них методом FISH (9 гомозиготних та 19 гетерозиготних делецій 9p21 CDKN2A). Експресія HER-2/neu на рівні 2+/3+ імуногістохімічним методом була виявлена в 15 з 61 (24,59 %) спостережень, але тільки в 9 з них мала місце дійсна ампліфікація гена ERBB2 на FISH. Наявність ампліфікації HER-2/neu в спостереженнях тільки п'яти імунофенотипів клініко-морфологічного синдрому «Рак невідомої первинної локалізації» (екстрагональний зародковий синдром, жінки з ізольованим папілярним канцероматозом, жінки з ізольованими метастазами карциноми в аксиллярні лімфатичні вузли, нейроендокринна карцинома та аденокарцинома колоректального профілю) робить його

корисним в диференційній діагностиці, порівняно із делецією 9p21 (p16<sup>INK4A</sup> / CDKN2A), що зустрічається значно частіше (усі імунотипи крім екстрагонадного зародкового синдрому), вірогідно як універсальна мутація дисемінованого перебігу карцином будь-яких локалізацій.

### ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Карциноми невідомого первинного походження складають дуже неоднорідну за гістологічними та молекулярно-генетичними характеристиками групу, тому для уникнення діагностичних помилок визначення первинної локалізації анонімних метастазів низькодиференційованих та недиференційованих пухлин повинні враховуватися результати імуногістохімічних досліджень, цифрової морфометрії та FISH.

2. Трагування сприятливих імунотипів клініко-морфологічного синдрому «Рак невідомої первинної локалізації» як потенційно курабельних первинних пухлин відомих локалізацій повинно базуватись на відповідності ІГХ та МФМ показників:

- для ІПК у жінок відповідність фенотипу серозній АКЯ [СК 7 (+), СА-125 (+), СК 20 (-), ER (+/-), PGR (+/-), WT-1 (+), PAX-8 (+)] площа 28,9±8,09, периметр 21,3±2,56, коефіцієнт круглості 0,68±0,14;

- для АК з ураженням ізольованих одnobічних АЛВ у жінок відповідність фенотипу карциноми МЗ [СК 7 (+), СК 20 (-), PAX-8 (-) ER (+/-), PGR (+/-), HER-2/neu (+/-)], площа 41,1±9,67, периметр 25,5±2,96, коефіцієнт круглості 0,70±0,12;

- для чоловіків з метастатичним ураженням кісток і підвищенням рівня серологічного маркера PSA відповідність фенотипу ацинарній АК ПЗ [СК 8 (+), PSA (+), AMACR (p504s) (+), AR (+/-)], площа 49,8 ± 9,93, периметр 27,6 ± 2,97, коефіцієнт круглості 0,77 ± 0,11;

- для АК колоректального профілю відповідність фенотипу колоректального раку [СК 20 (+), СК 7 (-), CDX-2 (+)], площа 38,9±12,31, периметр 23,9±3,75, коефіцієнт круглості 0,75±0,08;

- для низькодиференційованої карциноми з розташуванням по середній лінії тіла (екстрагонадний зародковий синдром) відповідність ембріональній карциномі [CD30 (+), EMA (+), Pan СК AE1/3 (+)], площа 31,4±2,72, периметр 25,2±2,35, коефіцієнт круглості 0,75±0,12;

- для метастазів ПР в ЛВШ відповідність фенотипу ПР голови та шиї [СК HMW (+), p63 (+), СК 7 (-), TTF-1 (-), p16<sup>INK4A</sup> (+/-)], площа 75,5±27,78, периметр 44,1±11,12, коефіцієнт круглості 0,88±0,05;

- для метастазів ПР в ПЛВ відповідність фенотипу ПР шийки матки (для жінок) [СК HMW (+), p63 (+), СК 7 (-), TTF-1 (-), p16<sup>INK4A</sup> (+)], площа 55,5±9,93, периметр 29,7±3,42, коефіцієнт круглості 0,79±0,05 та ПР зовнішніх статевих органів (для чоловіків) [СК HMW (+), p63 (+), СК 7 (-), TTF-1 (-), p16<sup>INK4A</sup> (+/-)], площа 62,3±8,38, периметр 30,6±3,71, коефіцієнт

круглості  $0,73 \pm 0,04$ ;

- для НЕК (G3) відповідність фенотипу дрібноклітинної карциноми легенів [Chromogranin A (+), Synaptophysin (+), CK 7 (+), TTF-1 (+), CD56 (+)], площа  $25,3 \pm 4,99$ , периметр  $18,9 \pm 1,89$ , коефіцієнт круглості  $0,74 \pm 0,08$ ;

- для метастазів КKM відповідність імунофенотипу [Pan CK AE1/3 (парануклеарно +), CK 20 (парануклеарно +), Chromogranin A (+/-), Synaptophysin (+/-)], площа  $37,3 \pm 5,69$ , периметр  $23,1 \pm 1,52$ , коефіцієнт круглості  $0,79 \pm 0,04$ .

3. Метод FISH більш доцільний при оцінюванні ампліфікації гену ERBB2 та делеції 9p21 для CDKN2A в спостереженнях раків невідомих первинних локалізацій, тому що зміни експресії відповідних протеїнів HER-2/neu (2+/3+) та p16<sup>INK4A</sup> (ядерно-цитоплазматична +) не завжди співпадають з наявністю дійсного генетичного ушкодження.

### **СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**

1. Особливості імуногістохімічної діагностики меланоцитарних новоутворень. І. С. Шпонька, О. В. Пославська, П. О. Гриценко та ін. *Морфологія*. 2013. Т. VII, № 4. С. 91-96. *(Дисертанту належить ідея та дизайн дослідження, відбір архівного матеріалу й статистична обробка результатів)*.

2. Особливості морфологічних варіантів плоскоклітинного раку верхньощелепної пазухи: імуногістохімічна характеристика. О. В. Ковтуненко, І. С. Шпонька, О. В. Пославська та ін. *Морфологія*. 2014. Т. 8, № 3. С. 27-34. *(Дисертанту належить проведення гістологічного та ІГХ досліджень)*.

3. Прогностичні імуногістохімічні показники регіонарного метастазування плоскоклітинних раків гортані. О. В. Ковтуненко, І. С. Шпонька, О. В. Пославська та ін. *Морфологія*. 2014. Т. 8, № 4. С. 30-36. *(Дисертанту належить проведення гістологічного та ІГХ досліджень)*.

4. Шпонька И. С., Пославская А. В., Яковенко В. Р. Значение иммуногистохимического метода для диагностики опухолей желудка. *Российский медико-биологический вестник им. акад. И.П. Павлова*. 2014. Т. 22, №4. С. 15-21. *(Дисертанту належить відбір архівного матеріалу, проведенні ІГХ та статистичний аналіз результатів)*.

5. Пославська О. В. Методологія використання програмного забезпечення для аналізу цифрових мікрофотографій на базі курсу патоморфології з метою підвищення професійного рівня студентів і науковців. *Морфологія*. 2015. Т. 9, № 3. С. 122-126.

6. Пославська О. В. Особливості імуногістохімічної діагностики нейроендокринних пухлин. *Морфологія*. 2015. Т. 9, № 4. С. 66-71.

7. Пославська О. В. Визначення лінійних розмірів та площ окремих морфологічних об'єктів на мікрофотографіях за допомогою програми ImageJ. *Морфологія*. 2016. Т. 10, № 3. С. 377-381.

8. Морфометричний аналіз «панцитокератин-позитивних» непластичних уражень лімфатичних вузлів ший. О. В. Пославська, І. С. Шпонька, П. О. Гриценко та ін. *Патологія*. 2017, Т 14, №3 (41). С. 287-292. DOI: 10.14739/2310-1237.2017.3.118730. (Дисертанту належить ідея та дизайн дослідження, відбір архівного матеріалу, проведення МФМ й статистична обробка результатів).

9. Морфометричний аналіз «панцитокератин-негативних» непластичних уражень лімфатичних вузлів ший. О. В. Пославська, І. С. Шпонька, П. О. Гриценко та ін. *Медичні перспективи*. – 2018, Том XXIII, №1. С. 30-37. DOI: <https://doi.org/10.26641/2307-0404.2018.1.124915>. (Дисертанту належить ідея та дизайн дослідження, відбір архівного матеріалу, проведення МФМ й статистична обробка результатів).

10. Пославська О. В., Шпонька І. С. Плоскоклітинний рак невідомої первинної локалізації: ізольоване ураження лімфатичних вузлів ший. *Медичні перспективи*. 2018, Том XXIII, №2. С. 13-20. DOI: <https://doi.org/10.26641/2307-0404.2018.2.133692>. (Дисертанту належить ідея та дизайн дослідження, відбір та аналіз архівного матеріалу, проведення МФМ й статистична обробка результатів).

11. Карциноми невідомої первинної локалізації з ізольованим одностороннім ураженням пахвових лімфатичних вузлів у жінок. О. В. Пославська, І. С. Шпонька, П. О. Гриценко та ін. *Морфологія*. 2018. Т. 12, № 3. С. 127-132. DOI: <https://doi.org/10.26641/23071997-9665.2018.3.127-132>. (Дисертанту належить ідея та дизайн дослідження, відбір та аналіз архівного матеріалу, проведення імуногістохімічних, морфометричних досліджень й статистична обробка результатів).

12. Пославська О. В., Шпонька І. С., Гриценко П. О. Особливості колоректального фенотипу карцином невідомої первинної локалізації. *Вісник Української медичної стоматологічної академії «Актуальні проблеми сучасної медицини»*. 2018. Т. 18, № 3 (63). С.111-115. (Дисертанту належить ідея та дизайн дослідження, відбір та аналіз архівного матеріалу, проведення ІГХ, МФМ й статистична обробка результатів).

13. Ізольований канцероматоз черевної порожнини у жінок: особливості імунофенотипів та морфометричних показників. О. В. Пославська, І. С. Шпонька, О. А. Савченко, та ін. *Медичні перспективи*. 2018. Т. XXIII, №3. С. 27-35. DOI: <https://doi.org/10.26641/2307-0404.2018.3.147951>. (Дисертанту належить ідея та дизайн дослідження, аналіз архівного матеріалу, проведення ІГХ, МФМ й статистична обробка результатів).

14. Пославська О. В. Прогностичні маркери в імуногістохімічній діагностиці метастазів карцином колоректального фенотипу невідомої первинної локалізації. *Вісник Української медичної стоматологічної академії*

«Актуальні проблеми сучасної морфології». 2019. Т. 19, №1 (65). С. 77-83. DOI: 10.31718/2077-1096.19.1.77.

**15.** Пославська О. В. Метастази карцином з клітин Меркеля з погляду діагностики пухлин невідомої первинної локалізації. *Медичні перспективи*. 2019. Т. XXIV, №1. С. 40-45. DOI: <https://doi.org/10.26641/2307-0404.2019.1.162178>.

**16.** Метастатичне ураження кісток у чоловіків у поєднанні з підвищенням сироваткового PSA з погляду діагностики карцином невідомої первинної локалізації. О. В. Пославська, І. С. Шпонька, П. О. Гриценко та ін. *Патологія*. 2019. Т. 16, №1 (45). С. 67-72. DOI: 10.14739/2310-1237.2019.1.166308. (Дисертанту належить ідея та дизайн дослідження, аналіз архівного матеріалу, МФМ й статистична обробка результатів).

**17.** Пославська О. В., Усова О. М. Нейроендокринні пухлини з невідомого первинного джерела: імуногістохімічні та морфометричні особливості. *Вісник Вінницького національного медичного університету*. 2019. Т. 23, №1. С. 143-147. DOI: 10.31393/reports-vnmedical-2019-23(1)-25. (Дисертанту належить концепція та дизайн дослідження, аналіз та інтерпретація даних, написання статті).

**18.** Пославська О. В., Шпонька І. С., Бабій Г. С. Діагностичне значення маркеру p16<sup>INK4A</sup> для верифікації пухлин невідомої первинної локалізації у жінок із ізольованим ураженням пахових лімфатичних вузлів. *Медичні перспективи*. 2019. Т. XXIV, №2. С. 13-19. DOI: <https://doi.org/10.26641/2307-0404.2019.2.170119>. (Дисертанту належить концепція та дизайн дослідження, аналіз та інтерпретацію даних, написання статті).

**19.** Пославська О. В. Діагностика пухлин із герміногенних клітин в позагонадних ділянках з погляду визначення метастазів карцином невідомої первинної локалізації. *Вісник Української медичної стоматологічної академії «Актуальні проблеми сучасної морфології»*. 2019. Т. 19, №2 (66). С. 128-133. DOI: 10.31718/2077-1096.19.2.128.

**20.** Пославська О. В., Шпонька І. С. Особливості експресії прогностичних маркерів p16 й HER-2/neu та зміни відповідних генів в окремих фенотипах раків невідомого первинного походження. *Морфологія*. 2019. Т. 13, № 3. С. 99-106. DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2019.3.99-106>. (Дисертанту належить ідея дослідження, відбір та аналіз архівного матеріалу, проведення ІГХ, FISH й статистична обробка результатів).

**21.** Шпонька І. С., Пославська О. В., Савченко О. А. Значення серозних інтраепітеліальних карцином маткових труб для виникнення “high-grade” серозних карцином яєчників та / або перитонеальних серозних карцином невідомої первинної локалізації. *Медичні перспективи*. 2020. Т. 25, № 1. С. 79-87. DOI: <https://doi.org/10.26641/2307-0404.2020.1.200405>. (Дисертанту належить ідея та дизайн дослідження, проведення ІГХ та МФМ дослідження, статистична обробка результатів).



**22.** Пославська О. В., Шпонька І. С. Морфометричні та імуногістохімічні особливості TTF-1 позитивних пухлин легенів: вдосконалення підходів в діагностиці метастазів без первинного джерела. *ScienceRise: Medical Science*. 2020. Т. 35, №2. С. 29-34. DOI: 10.15587/2519-4798.2020.199841 (*Дисертанту належить ідея та дизайн дослідження, відбір архівного матеріалу й статистична обробка результатів*).

**23.** Пославська О. В., Лимар Л. І. Імуногістохімічна діагностика новоутворень меланоцитарного походження. *Актуальні питання теоретичної та практичної медицини*: зб. тез доповідей II Міжнародної науково-практичної конференції студентів та молодих вчених (м. Суми, 16-18 квітня 2014 р.). Суми: Сумський державний університет, 2014. С. 165. (*Дисертанту належить концепція та дизайн дослідження, аналіз та інтерпретація даних*).

**24.** Пославська О. В. Особливості імуногістохімічної діагностики метастазів без відомої первинної локалізації. *Здобутки теоретичної медицини - в практику охорони здоров'я*: матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених та студентів (м. Запоріжжя, 24-25 березня 2016 р.). Запоріжжя, 2016. С. 18-19.

**25.** Poslavs'ka O. V. Immunohistochemical features of neuroendocrine tumors. *Сучасні теоретичні та практичні аспекти клінічної медицини*: тези доп. наук.- практ. конф. з міжнар. участю, присвячена 150-річчю з дня народження Д. К. Заболотного (м. Одеса, 21-22 квітня 2016 р.). Одеса: ОНМедУ, 2016. С. 150.

**26.** Пославська О., Переута Ю., Яроміч І. Імуногістохімічні аспекти діагностики новоутворень з невідомою первинною локалізацією. *Сучасні погляди на актуальні питання теоретичної, експериментальної та практичної медицини*: матеріали XX Міжнародного медичного конгресу студентів та молодих вчених (м. Тернопіль, 25-27 квітня 2016 р.) Тернопіль: Укрмедкнига, 2016. С. 222. (*Дисертанту належить концепція та дизайн дослідження, аналіз та інтерпретація даних*).

**27.** Пославська О. В., Шпонька І. С., Савченко О. А. Імуногістохімічні аспекти діагностики анапластичних пухлин. *Новини і перспективи медичної науки*: матеріали XVI Міжнародної конференції студентів та молодих учених. Дніпропетровськ, 2016. С. 71. (*Дисертанту належить концепція дослідження, аналіз та інтерпретація даних*).

**28.** Пославська О. В., Алексеєнко О. А., Чекан С. М. Дослідження «панцитокератин-негативних» непластичних ушкоджень лімфатичних вузлів шиї: імуноморфологічні аспекти. *Актуальні питання біології та медицини*: матеріали Всеукраїнської наукової конференції (м. Суми, 16-17 листопада 2017 р.). Суми, 2017. С. 50. (*Дисертанту належить концепція та дизайн дослідження, аналіз та інтерпретація даних*).

**29.** Savchenko O., Poslavska O., Savchenko P. Carcinose papillaire abdominal sans localisation primaire chez les femmes: donnees statistiques,

caracteristiques morphologiques et immunophenotypes. *Langues, Sciences et Pratiques: actes du 2 Colloque international francophone et Ukraine* (Dnipro, 3-4 octobre, 2018). Dnipro, 2018. С. 185-186. (Дисертанту належить ідея та дизайн дослідження, проведення ІГХ та МФМ досліджень, статистична обробка результатів).

**30.** Пославська О. В., Гриценко П. О., Федченко М. П. Морфометричні характеристики колоректального фенотипу раку невідомої первинної локалізації. *Теорія та практика сучасної морфології: матеріали другої всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю* (м. Дніпро, 10-12 жовтня 2018 р.). Дніпро, 2018. С. 131-133 р. (Дисертанту належить ідея та дизайн дослідження, систематизація архівного матеріалу, проведення ІГХ та МФМ досліджень, статистична обробка результатів).

**31.** Пославська О. В., Савченко П. В. Особливості карцином невідомої первинної локалізації з ізольованим одностороннім ураженням пахвових лімфатичних вузлів у жінок. *Сьогоднішня біологічної науки: II Міжнародна наукова конференція* (м. Суми, 9-10 листопада 2018 р.). Суми, 2018. С. 229-232. (Дисертанту належить ідея та дизайн дослідження, проведення ІГХ та МФМ досліджень, статистична обробка результатів).

**32.** Пославська О. В., Шпонька І. С., Савченко О. А. Особливості фенотипів папілярного канцероматозу черевної порожнини без первинної локалізації у жінок. *Медична наука в практику охорони здоров'я: Всеукраїнська науково-практична конференція молодих учених* (м. Полтава, 16 листопада 2018р.). Полтава, 2018. С. 37-38. (Дисертанту належить ідея та дизайн дослідження, систематизація архівного матеріалу, проведення МФМ досліджень, статистична обробка результатів).

**33.** Пославська О. В. Ізольовані метастази кісток у чоловіків із підвищенням сироваткового маркеру PSA з погляду морфологічної діагностики карцином невідомої первинної локалізації. *"Scientific Research Priorities: theoretical and practical value" III International scientific and practical conference* (Nowy Sacz, Poland, 27-30 November 2018р.) Nowy Sacz, Poland, 2018. P. 224-225.

**34.** Пославська. О. В. Ізольовані метастази кісток у чоловіків із підвищенням сироваткового маркера PSA з погляду морфологічної діагностики карцином невідомої первинної локалізації. *Фундаментальна медицина: інтегральні підходи до терапії хворих з онкологією: науково-практична конференція молодих вчених* (м. Київ, 4-5 лютого 2019 р.). Онкологія. 2019. Т. 21, №1. С. 70-71.

**35.** Poslavska O. V., Hrytsenko P. O., Babiy H. S. Isolated damage to the inguinal lymph nodes from the point of view of diagnostic tumors of an unknown primary site. *Сучасна патоморфологічна діагностика в клінічній практиці лікаря: мат. Міжн. наук.-практ. конф.* (м. Вінниця, 10-11 квітня 2019 р.). Вінниця : ТОВ «Твори», 2019. С. 89-91. (Дисертанту належить ідея та

дизайн дослідження, систематизація архівного матеріалу, статистична обробка результатів).

**36.** Savchenko O., Poslavska O., Savchenko P. L'étude du phenotype immunohistochimie des metastases dans les ganglions axillaires de la tumeur sans localisation primaire connue par rapport au phenotype immunohistochimie du cancer du sein chez la femme de la region de Dnipropetrovsk. *Langues, Sciences et Pratiques: actes du 3 Colloque international francophone en Ukraine* (Odessa, 3-4 Octobre, 2019). Odessa, 2019. С. 185-186. (Дисертанту належить ідея та дизайн дослідження, систематизація архівного матеріалу, проведення ІГХ та МФМ досліджень, статистична обробка результатів).

**37.** Poslavska O. V., Shponka I. S. Features of the expression of prognostic markers p16, HER-2/neu and changes in the corresponding genes in individual phenotypes of cancers of unknown primary origin. *Теорія та практика сучасної морфології: матеріали третьої всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю* (м. Дніпро, 9-11 жовтня 2019 р.). Дніпро, 2019. С. 108 р. (Дисертанту належить ідея та дизайн дослідження, відбір та аналіз архівного матеріалу, проведення ІГХ, FISH досліджень й статистична обробка результатів).

**38.** Патент на корисну модель № 111478 Україна, МПК G01N 33/48, G01N 33/53. Спосіб прогнозування метастазів плоскоклітинного раку гортані / Ковтуненко О. В., Шпонька І. С., Шпортько Б. В., Тимчук С. М., Пославська О. В.; заявник та патентовласник ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України». - № u201605077; заявл. 10.05.16; опубл. 10.11.16, Бюл. № 21 (2016). (Дисертанту належить проведення гістологічного та ІГХ досліджень, описання морфологічної частини корисної моделі).

**39.** Інформаційний лист № 68-2019 про нововведення в системі охорони здоров'я «Спосіб прогнозування метастазів раку гортані», авторів д.м.н., проф. Ковтуненка О. В., д.м.н., проф. Шпоньки І. С., Шпортько Б. В., к.м.н. Пославської О. В.; установи-розробника: «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», м. Київ. Випуск 2 з проблеми «Отоларингологія» (Дисертанту належить проведення гістологічного та ІГХ досліджень).

## АНОТАЦІЯ

**Пославська О. В. Діагностика анапластичних пухлин та пухлин без встановленої первинної локалізації: імуноморфологічні аспекти. – На правах рукопису.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю 14.03.02 – патологічна анатомія. – Запорізький державний медичний університет МОЗ України, Запоріжжя, 2020.

В дисертаційній роботі для покращення біопсійної діагностики недиференційованих (анапластичних) пухлин та метастазів пухлин з невідомого первинного джерела досліджено імуногістохімічні фенотипи та морфометричні характеристики «площа», «периметр» та «коефіцієнт

круглості» шляхом обробки цифрових мікрофотографій зрізів програмою ImageJ в пухлинах епітеліального, мезенхімального, меланоцитарного та гемолімфоцитарного походження. Визначені категорії верифікації анонімних метастатичних уражень для розуміння ефективності імуногістохімічного методу в діагностиці пухлин з невідомого джерела. Сформовані імуногістохімічні та морфометричні критерії для сприятливих імунофенотипів синдрому «Рак невідомої первинної локалізації». Визначено частку імунофенотипів синдрому «Рак невідомої первинної локалізації» з наявністю ампліфікації гену ERBB2 й делеції локусу 9p21 гену CDKN2A методом FISH та порівняно із відповідною зміною експресії протеїнів HER-2/neu та p16<sup>INK4A</sup>.

**Ключові слова:** недиференційовані (анапластичні) пухлини, карциноми невідомої первинної локалізації, імуногістохімія, FISH, морфометрія, ImageJ.

### АННОТАЦИЯ

**Пославская А. В. Диагностика анапластических опухолей и опухолей без установленной первичной локализации иммуноморфологические аспекты. - На правах рукописи.**

Диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 14.03.02 - патологическая анатомия. - Запорожский государственный медицинский университет МЗ Украины, Запорожье, 2020.

В диссертационной работе для улучшения биопсийной диагностики недифференцированных (анапластических) опухолей и метастазов опухолей из неизвестного первичного источника исследованы иммуногистохимические фенотипы и морфометрические характеристики «площадь», «периметр» и «коэффициент круглости» путем обработки цифровых микрофотографий срезов программой ImageJ в опухолях эпителиального, мезенхимального, меланоцитарного и гемолімфоцитарного происхождения. Определены категории верификации анонимных метастатических поражений для понимания эффективности иммуногистохимического метода в диагностике опухолей неизвестного происхождения. Сформированы иммуногистохимические и морфометрические критерии для благоприятных иммунофенотипов синдрома «Рак неизвестной первичной локализации». Определена часть иммунофенотипов синдрома «Рак неизвестной первичной локализации» с наличием амплификации гена ERBB2 и делеции локуса 9p21 гена CDKN2A методом FISH в сравнении с соответствующим изменением экспрессии протеинов HER-2 / neu и p16<sup>INK4A</sup>.

**Ключевые слова:** недифференцированные (анапластические) опухоли, карциномы неизвестной первичной локализации, иммуногистохимия, FISH, морфометрия, ImageJ.

### ABSTRACT

**Poslavska O. V. Diagnosis of anaplastic tumors and tumors without**

**established primary localization: immunomorphological aspects. – Qualifying scientific work as a manuscript copyright.**

Thesis for a doctor degree in specialty 14.03.02 «Pathological anatomy» (22 – The Ministry of Health). – Zaporizhia State Medical University of the Ministry of Health of Ukraine, Zaporizhia, 2020.

In the dissertation work to improve the biopsy diagnosis of undifferentiated (anaplastic) tumors and tumor metastases from an unknown primary site, immunohistochemical (IHC) phenotypes and morphometric (MPM) characteristics of "area", "perimeter" and "round" were studied in tumors of epithelial, mesenchymal, melanocyte and hemolymphocyte origin; defined categories of verification of anonymous metastatic lesions to understand the effectiveness of the IHC method in the diagnosis of tumors from an unknown site; formed IHC and MPM criteria for favorable immunophenotypes of the syndrome "Cancer of unknown primary site" (CUP); a part of CUP with the presence of ERBB2 gene amplification and deletion of the 9p21 locus of the CDKN2A gene by the FISH method was determined and compared with the corresponding change in the expression of HER-2/neu and p16<sup>INK4A</sup> proteins.

The first stage of the work included a retrospective study of archival material 41 cases of metastatic lesions of the lymph nodes of the neck by tumors of different histogenesis. Carrying out in these samples of MPM analysis of the size of tumor cell nuclei and comparing them with the size of normal lymphocytes allowed to objectively determine the categories of tumors by size: "really small cell tumors" with an area up to 30  $\mu\text{m}^2$ , perimeter up to 25  $\mu\text{m}$ , but different values of roundness (the closer the latter was to unity, the rounder the nucleus); "medium cell tumors" with an area of 30 - 50  $\mu\text{m}^2$ , perimeter 25 - 35  $\mu\text{m}$  and also different values of the roundness, "large cell tumors" with an area of more than 50  $\mu\text{m}^2$ , perimeter - more than 35  $\mu\text{m}$  and different values of the roundness; and separately identify a difficult to diagnose group of "small round blue cells tumors", which had ranges of 30 - 45  $\mu\text{m}^2$  in area, 25 - 35  $\mu\text{m}$  in perimeter and well-defined limits of roundness – 0.75 - 0.90. Given the anaplastic structure of tumors from the group of "small round blue cells" and the specificity of their IHC profile, it is advisable in case of obtaining such MPM indicators to change the standard primary IHC panel [Pan CK AE1/3, Vimentin, CD45, S100 and / or HMB45 to [Pan CK AE1/3, Desmin, CD45, CD56, CD99, S100 and / or HMB45] to reduce the time and cost of IHC study. Also, at the first stage of work from 41 cases of metastatic lesions of the lymph nodes of the neck with a clinical diagnosis of "malignant tumor of unknown origin" (category 1) after retrospective analysis of IHC, the percentages of CUP 2 and 3 categories were determined. After the primary panel of IHC, it was found that only a third - 34.15 % (14 of 41) were metastases of carcinoma, or so-called "previous CUP" (category 2). After the secondary panel of IHC, it was found that in 35.71 % (5 of 14) the expression of organ-specific markers was found (localization was determined), and the other 64.29 % (9 of 14) were divided into favorable phenotypes of the CUP syndrome, (21.43 % (3 of 14), 2 metastases of

squamous cell carcinoma to the lymph nodes of the neck, 1 metastasis of Merkel cells carcinoma) and unfavorable phenotypes of the CUP syndrome (42.86 % (6 of 14); adenogenic low-grade cancers with phenotypes [Pan CK AE1/3 (+), Vimentin (- or +), CK 7 (+)] and undifferentiated cancers with [Pan CK AE1/3 (+), Vimentin (- or +)]. In the absence of complete clinical data about the possible tumor origin, these 9 of 14 (64.28 %) metastatic cancers or 9 of 41 (21.95 %) of all neoplasm formed a group of "confirmed CUP" (category 3) and left patients actually undiagnosed. Checking the world statistics, where the 3rd category of "confirmed CUP" accounts for only 3-5 %, it is clear that the percentage of observations of metastatic lesions of category 3 in our work is significantly inflated, probably due to incomplete examination of cancer patients at the clinical "pre-biopsy stage".

The second phase was devoted to the study of nine favorable phenotypes of CUP syndrome and the comparison of their characteristics with locally advanced forms of the corresponding carcinomas.

In the third stage, from the 61 cases of CUP, IHC expression of p16<sup>INK4A</sup> was positive in 31 observations (50.8 %), which in the FISH study showed 24 (9 homozygous and 19 heterozygous) deletions of 9p21, which occurred in 8 of 9 (88.89 %) of the studied phenotypes of CUP, except for low-grade carcinoma with distribution along the midline of the body (extragonadal embryonic cell syndrome). IHC expression of HER-2/neu at the level of 2+/3+ was detected in 15 of 61 (24.59 %) CUP, but only in 9 observations had a real amplification of the ERBB2 gene on FISH in 5 of 9 (55.55 %) phenotypes: extragonadal embryonic cell syndrome, women with isolated papillary carcinomatosis, women with metastasis to the axillaries lymph nodes, metastasis of poorly differentiated NEC and adenocarcinoma with a profile of colorectal cancer. The small number of phenotypes with amplification of the ERBB2 gene on FISH makes it more specific for the differential diagnosis of CUP, compared with the deletion of 9p21 (p16<sup>INK4A</sup> / CDKN2A), which is probably universal in the acquisition of invasive and aggressive carcinomas of different localizations.

**Key words:** undifferentiated (anaplastic) tumors, carcinomas of unknown primary site (CUP), immunohistochemistry, FISH, morphometry, ImageJ.

## **ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ**

АК – аденокарцинома  
АКЛ – аксиллярні лімфатичні вузли  
ІГХ – імуногістохімічне (дослідження)  
ІП – індекс проліферації  
ІПК – ізольований папілярний канцероматоз  
ККМ – карцинома з клітин Меркеля  
КРР – колоректальний рак  
ЛВШ – лімфатичні вузли шиї  
МФМ – морфометричне (дослідження)  
МЗ – молочна залоза  
МТ – маткова труба  
НДР – недиференційований рак  
НЕП/НЕК – нейроендокринна пухлина/нейроендокринна карцинома  
ПГК – пухлини з герміногенних клітин  
ПЗ – передміхурова залоза  
ПЛВ – пахові лімфатичні вузли  
ПР – плоскоклітинний рак  
РНПЛ – раки невідомої первинної локалізації  
AR – androgen receptors  
CA-125 – carbohydrate antigen 125 (mucin 16)  
CDX-2 – caudal type homeobox 2  
СК – cytokeratin  
СК НМВ – cytokeratin high molecular weight  
CUP – cancer of unknown primary site  
ER – estrogen receptors (рецептори до естрогенів)  
FISH – Fluorescence in situ hybridization (флюоресцентна гібридизація in situ)  
HER-2/neu – human epidermal growth factor receptor-2  
МРМ – morphometric investigation  
PGR – progesterone receptors (рецептри до прогестеронів)  
PSA – prostate-specific antigen (простат-специфічний антиген)  
TTF-1 – thyroid transcription factor - 1  
WT-1 – Wilms tumor protein – 1

Підписано до друку 28.12.2020. Гарнітура Times New Roman  
Папір друкарський. Формат 60 90 1/16. Умовн. друк. арк. 0,9  
Наклад – 100 прим. Замовлення №86.  
Надруковано з оригінал-макету в типографії ВТК «Друкар»,  
м. Дніпро, пл. Соборна, 4