

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ДНІПРОПЕТРОВСЬКА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ**

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ПОСЛАВСЬКА ОЛЕКСАНДРА ВОЛОДИМИРІВНА

УДК: 616-006.04-076-097.3-079.4

ДИСЕРТАЦІЯ

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

14.03.02 – патологічна анатомія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук.

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

_____ О. В. Пославська.

Науковий консультант – Шпонька Ігор Станіславович, заслужений діяч науки і техніки України, доктор медичних наук, професор

Запоріжжя – 2020

АНОТАЦІЯ

Пославська О. В. Діагностика анапластичних пухлин та пухлин без встановленої первинної локалізації: імуноморфологічні аспекти. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю 14.03.02 «Патологічна анатомія» (22 Охорона здоров'я). – ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», Дніпро, 2020.

Запорізький державний медичний університет МОЗ України, Запоріжжя, 2020.

В дисертаційній роботі з метою покращення біопсійної діагностики недиференційованих (анапластичних) пухлин та метастазів пухлин з невідомого первинного джерела досліджено морфометричні характеристики «площа», «периметр» та «коефіцієнт круглості» шляхом обробки цифрових мікрофотографій пухлин епітеліального, мезенхімального, меланоцитарного та гемоліфоцитарного походження у програмі ImageJ з подальшим визначенням границь значень морфометричних показників для таких категорій пухлин як «дрібноклітинні», «середньоклітинні», «величкклітинні» та окремо для «дрібно-кругло-синьо-клітинних» пухлин, порівняно з розмірами нормальних лімфоцитів; серед патогістологічних діагнозів архівного матеріалу ретроспективно визначені відсотки категорій верифікації карцином невідомої первинної локалізації для розуміння ефективності міждисциплінарного підходу в діагностиці пухлин з невідомого джерела; сформовані імуногістохімічні та морфометричні характеристики для верифікації сприятливих імунофенотипів клініко-морфологічного синдрому «Рак невідомої первинної локалізації»; досліджені спостереження сприятливих фенотипів клініко-морфологічного синдрому «Рак невідомої первинної локалізації» з наявністю ампліфікації гену ERBB2 й окремо делеції локусу 9p21 гену CDKN2A методом FISH та порівняно із відповідною зміною експресії протеїнів HER-2/neu та p16^{INK4A} імуногістохімічним методом дослідження.

Перший етап роботи включав ретроспективне дослідження архівного матеріалу 41 випадку метастатичних уражень лімфатичних вузлів шиї пухлинами різного гістогенезу. Проведення в цих зразках цифрової морфометрії розмірів ядер клітин пухлин та порівняння їх з розмірами звичайних лімфоцитів лімфатичних вузлів шиї дозволило об'єктивно визначити категорії пухлин за розмірами: «дійсно дрібноклітинні пухлини» з площею до 30 мкм^2 , периметром до 25 мкм, але різними значеннями коефіцієнту круглості (чим останній був ближчим до одиниці, тим ядро круглішало); «середньоклітинні пухлини» з площею $30 - 50 \text{ мкм}^2$, периметром $25 - 35 \text{ мкм}$ і також різними значеннями коефіцієнту круглості, «великоклітинні пухлини» площею більше 50 мкм^2 , периметром – більше 35 мкм і різними значеннями коефіцієнту круглості; та окремо виділити важку для діагностики групу «дрібно-кругло-синьо-клітинних пухлин» (small round blue cells tumors), які мали діапазони $30 - 45 \text{ мкм}^2$ за площею, $25 - 35 \text{ мкм}$ за периметром і точно визначені межі коефіцієнту круглості – $0,75 - 0,90$. Враховуючи подібну недиференційовану (анапластичну) будову пухлин з групи «дрібно-кругло-синьо-клітинних» саме морфометричні показники дають об'єктивні підстави мінять стандартну первинну імуногістохімічної панель [Pan CK AE1/3, Vimentin, CD45, S100 і/або НМВ45] на більш специфічну саме для «дрібно-кругло-синьо-клітинних» пухлин [Pan CK AE1/3, Desmin, CD45, CD56, CD99, S100 і/або НМВ45] для зменшення часу та вартості діагностики.

Також, на першому етапі роботи з 41 випадку метастатичних уражень лімфатичних вузлів шиї з клінічним діагнозом (категорія 1) після ретроспективного аналізу імуногістохімії були визначені відсотки карцином з невідомого джерела 2 та 3 категорій. Після первинної імуногістохімічної панелі виявилось, що тільки третина – $34,15 \%$ (14 з 41) були метастазами карцином, або, так звані, «попередні раки невідомої первинної локалізації» (категорія 2). Після вторинної імуногістохімічної панелі з'ясувалось, що в $35,71 \%$ (5 з 14) було знайдено експресію органоспецифічних маркерів (визначилась локалізація), а інші $64,28 \%$ (9 з 14) розподілились на сприятливі фенотипи клі-

ніко-морфологічного синдрому «Рак невідомої первинної локалізації» (21,43 % (3 з 14) – 2 метастази плоскоклітинного раку в лімфатичні вузли шиї, 1 метастаз карциноми з клітин Меркеля) та несприятливі фенотипи (42,86 % (6 з 14) – аденогенні низькодиференційовані раки з фенотипами [Pan CK AE1/3 (+), Vimentin (- або +), CK 7 (+)] та недиференційовані раки з [Pan CK AE1/3 (+), Vimentin (- або +)]). В умовах відсутності повних клінічних даних про можливе походження пухлини, ці 9 з 14 (64,29 %) метастатичних карцином, або 9 з 41 (21,95 %) усіх неоплазій, зформували групу «підтверджених раків невідомої первинної локалізації» (категорія 3) і залишили пацієнтів фактично без діагнозу. Перевіряючи світову статистику, де на 3 категорію «підтверджених раків невідомої первинної локалізації» припадає всього 3-5 %, зрозуміло, що отриманий відсоток спостережень метастатичних уражень 3 категорії в нашому дослідженні значно вищий, внаслідок неповного обстеження онкохворих на клінічному «до-біопсійному етапі».

Спостереження ізольованого папілярного канцероматозу у жінок (n=24) після імуногістохімічного дослідження розподілились таким чином, що більшість з них – 2/3 (15 з 24; 62,50 %) мали фенотипи аденокарцином яєчника з перевагою метастатичної серозної естроген (ER) - залежної аденокарциноми – 5 із 15 (33,33 %) – [CK 7 (+), CA-125 (+), CK 20 (-), ER (+), PAX-8 (+), WT-1 (+)], яка за морфометричними показниками площі мала вірогідно крупніші ядра клітин ($p < 0,05$) порівняно з первинними серозними аденокарциномами яєчника. Дослідження гіпотези єдиного джерела походження метастатичних серозних «high-grade» аденокарцином очеревини та яєчників з інтраепітеліальної неоплазії маткової труби визначило подібну аберантну експресію p53 в зразках серозних ізольованих папілярних канцероматозів, серозних аденокарцином яєчників «high-grade» варіанту та інтраепітеліальної неоплазії маткової труби ($p > 0,05$), а також їх схожість за імуногістохімічним профілем до дистальних фрагментів маткових труб: CK 7 строго (+), CK 20 строго (-), зниження CA-125 мембранного забарвлення в проксимальних фрагментах маткових труб, перевага WT-1 (+) реакцій в дистальних відділах ма-

ткових труб над проксимальними ($68,7 \pm 8,12$ % проти $36,8 \pm 7,81$ %; $p < 0,05$). Серозний ізольований папілярний канцероматоз у жінок характеризувався втратою ER й PGR, та навпаки збільшенням експресії HER-2/neu, порівняно з серозною аденокарциномою яєчників і інтраепітеліальною неоплазією маткової труби, але з достовірною різницею тільки для PGR ($p < 0,05$).

Дослідження анонімних метастазів карцином в однобічні аксилярні лімфатичні вузли у жінок виявило більшість – 22 із 29 ($75,86$ %) карцином імуністохімічного профілю подібного до молочної залози з перевагою фенотипу [Pan CK AE1/3 (+), CK 7 (+), ER (+), PGR (+), HER-2/neu (+/-), PAX-8 (-)], який мав достовірно менші площі ядер клітин ($p < 0,05$), порівняно з місцево-розповсюдженими карциномами молочної залози. Жінки з метастазами в аксилярні лімфатичні вузли профілю молочної залози мали достовірно більше три-негативних зразків [ER-, PGR-, HER-2/neu-] ($p < 0,05$) й були достовірно старшими ($66,23 \pm 11,09$ років проти $55,43 \pm 12,19$ років, $p < 0,05$), порівняно з жінками групи первинних карцином молочної залози.

Характеристики бластних метастазів кісток у чоловіків з підвищеним рівнем сироваткового PSA, включали перевагу метастатичних карцином низького ступеня диференціювання ($p < 0,05$), об'єктивне зменшення показників площі і периметру ядер клітин (обидва $p < 0,05$), зниження експресії специфічних для ацинарних карцином передміхурової залози діагностичних імуністохімічних маркерів PSA, p504s (AMACR) та AR ($p < 0,05$), порівняно з місцево-розповсюдженими карциномами передміхурової залози. Порівняння вікових характеристик цих груп ($50,00 \pm 9,89$ років проти $66,00 \pm 7,76$ років) достовірно визначило більш молодий вік в групі чоловіків з метастазами кісток ($p < 0,05$).

Спостереження карцином невідомої первинної локалізації з профілем колоректального раку [CK 20 (+), CDX-2 (+), CK 7 (-)] із низьким ступенем диференціації продемонстрували кластерене CK 7 (+) забарвлення в групах пухлинних клітин, що з огляду на великий відсоток серед таких пацієнтів жінок $48,65$ % та розташування метастазів колоректального профілю в репро-

дуктивних органах (здебільшого яєчників), потребує доповнення вторинної панелі імуногістохімічними маркерами виключення аденокарцином яєчників (CA-125, ER, WT-1, PAX-8). «Фокальна» (+) експресія p53, ядерна транлокація β -катеніна (>30 %) та надекспресія AMACR (++,+++) виявились достовірно частіше в метастазах колоректального профілю, порівняно із первинними колоректальними раками (всі $p < 0,05$). Позитивний статус HER-2/neu (градації 2+ і 3+) достовірно частіше зустрічався у чоловіків з метастазами колоректального профілю, 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; $p < 0,05$). Але серед жінок, порівняно з чоловіками, достовірно виявилось більше метастазів колоректального профілю з високим індексом проліферації за Ki-67 (23 з 29; 79,3 % проти 3 з 8; 37,5%; $p < 0,05$).

Через значну варіативність гістологічних патернів будови, наявність змішаних форм та нетипове розташування, імуногістохімічних метод набув ключового значення в діагностиці екстрагонадних пухлин із герміногенних клітин (екстрагонадний зародковий синдром), що включають низькодиференційовану ембріональну карциному, як фенотип клініко-морфологічного синдрому «Рак невідомої первинної локалізації». Позитивна експресія CD30, EMA і Pan CK AE1/3 виявилась діагностично значущою в зразках ембріональної карциноми, де морфометричні показники, в середньому, в 2,1 рази за площею та в 1,7 за периметром перевищували звичайні лімфоцити ($p_{пл} < 0,05$, $p_{пр} < 0,05$), на відміну від герміном/семіном, в яких маркери PLAP і CD117 показали найбільшу експресію, а значення цифрової морфометрії більше ніж в три рази за площею і два рази за периметром перевищували розміри звичайних лімфоцитів ($p_{пл} < 0,05$, $p_{пр} < 0,05$) та пухлин жовткового мішка з позитивним статусом за α FP (+) і морфометричними показниками, що більше ніж в 1,7 рази за площею та в 1,5 за периметром перевищували звичайні лімфоцити ($p_{пл} < 0,05$, $p_{пр} < 0,05$).

Дослідження зразків анонімних метастазів в лімфатичні вузли шиї виявило біля половини – 35 з 62 (56,45 %) метастазів плоскоклітинного раку з імуногістохімічним профілем подібним до групи плоскоклітинних раків голови і шиї відомих локалізацій з перевагою фенотипу [Pan CK AE1/3 (+), CK HMW (+), p63 (+), CK 20 (-), TTF-1 (-), Vimentin (-/+), CK 7 (-/+)]. Маркер p16^{INK4A} в первинних плоскоклітинних раках був негативним (інтрануклеарні реакції поодиноких клітин) в плоскоклітинних раках гортані, шкіри обличчя та нижньої губи та позитивним (змішана ядерно-цитоплазматична реакція скупчень «блоків» клітин) в 8 з 14 (57,14 %) плоскоклітинних раків ротоглотки та в 4 з 10 (40,00 %) плоскоклітинних раків верхньощелепної пазухи. В групі метастазів знайдено було тільки 3 з 35 (8,57 %) p16^{INK4A} (+) спостережень (2 жінки і 1 чоловік), що дало можливість припустити походження цих плоскоклітинних раків з ротоглотки або пазухи верхньої щелепи. Показники цифрової морфометрії площі, периметру та коефіцієнту круглості метастазів плоскоклітинних раків в лімфатичні вузли шиї порівняно з первинними плоскоклітинними раками голови та шиї, показали, що ядра клітин достовірно були менших розмірів за площею ($p < 0,05$) та більш витягнуті та поліморфні за коефіцієнтом круглості ($p < 0,05$), що відповідає низькодиференційованим гістологічним формам, які серед метастатичних плоскоклітинних карцином займали 16 з 35 (45,71 %).

На анонімні метастази плоскоклітинних раків в пахові лімфатичні вузли з усіх пахових аденопатій припало: у жінок 57,14 % (4 з 7), у чоловіків 25,00 % (1 з 4). Всі метастази плоскоклітинних раків продемонстрували фенотип [CK HMW (+), p63 (+), p16^{INK4A} («+» для жінок, «-» для чоловіків)]. Метастатичні плоскоклітинні раки у жінок і чоловіків мали достовірно менші площі та периметри ядер клітин (обидва $p < 0,05$), порівняно із первинними плоскоклітинними раками шийки матки у жінок і статевих органів у чоловіків, але подібний коефіцієнт круглості ($p > 0,05$).

З групи нейроендокринних пухлин без позитивних органоспецифічних реакцій (50 з 107; 46,73 %) відокремилась група низькодиференційованих

(G3) нейроендокринних карцином (31 з 50; 62,00 %), як фенотип клініко-морфологічного синдрому «Рак невідомої первинної локалізації», що мав достовірно більший індекс проліферації ніж нейроендокринні пухлини з G1 та G2 ($35,4 \pm 17,35$ проти $13,0 \pm 0,72$; $p < 0,05$). Порівняння даних цифрової морфометрії та індексу проліферації метастатичних нейроендокринних карцином (G3) без органоспецифічних ознак, як фенотипу синдрому «Рак невідомої первинної локалізації», з дрібноклітинними нейроендокринними карциномами (G3) легенів знайшло достовірну різницю площі ядер клітин ($p < 0,05$) та проліферативної активності за Ki-67 ($p < 0,05$). Натомість метастази нейроендокринної карциноми (G3) з імунофенотипом [Pan CK AE1/3 (+), Vimentin (-), Chromogranin A (+/-) і/або Synaptophysin (+/-) і/або CD56 (+), CK 20 (-), CK 7 (+), TTF-1 (+)] і вірогідним походженням з легенів за рахунок TTF-1 (+) такої різниці не виявили (всі $p > 0,05$). Спостереження метастазів карцином невідомої первинної локалізації можуть бути трактовані як метастази карциноми з клітин Меркеля, якщо вони демонструють фенотип [Pan CK AE1/3 (парануклеарно +), CK 20 (парануклеарно +), Chromogranin A (+/-) і/або Synaptophysin (+/-)], а також мають ядра, площа та периметр, які відповідають категорії «дрібно-кругло-синьо-клітинних» пухлин (всі $p > 0,05$).

З 61 випадку сприятливих фенотипів клініко-морфологічного синдрому «Рак невідомої первинної локалізації» експресія p16^{INK4A} виявилась позитивною в 31 спостереженні (51,4 %), що на FISH продемонструвало 28 (9 гомозиготних та 19 гетерозиготних) делецій 9p21 у 8 з 9 (88,89 %) досліджених фенотипів раків невідомої первинної локалізації, окрім низькодиференційованої карциноми з розподілом по середній лінії тіла (екстрагональний зародково-клітинний синдром). Експресія HER-2/neu на рівні (2+/3+) виявилась в 15 з 61 (24,59 %) спостережень, але тільки в 9 мала дійсну ампліфікацію гена ERBB2 на FISH у 5 з 9 (55,55 %) фенотипах: екстрагональний зародково-клітинний синдром; жінки з ізольованим папілярним канцероматозом; жінки з метастазом в аксиллярні лімфатичні вузли; метастаз низькодиференційованої нейроендокринної карциноми, аденокарцинома з профілем колоректаль-

ного раку. Невелика кількість фенотипів з ампліфікацією гену ERBB2 на FISH робить його більш специфічним для диференційної діагностики карцином невідомого походження, порівняно із делецією 9p21 (p16^{INK4A} / CDKN2A), що вірогідно носить універсальний характер набуття інвазивного та агресивного перебігу для карцином різних локалізацій.

Наукова новизна. 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 [СК 7 (+), СА-125 (+), СК 20 (-), ER (+), PAX-8 (+), WT-1 (+), p16INK4A (+), 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 p16INK4A до делеції локусу 9p21 гену CDKN2A в метастатичних карциномах невідомої первинної локалізації.

Практичне значення. 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 мкм² 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 і/або HMB45] на [Pan CK AE1/3, Desmin, CD45, CD56, CD99, S100 і/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 p16INK4A 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».

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

ANNOTATION

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 – Health care). – State Institution "Dnipropetrovsk Medical Academy of the Ministry of Health of Ukraine", Dnipro, 2020.

Zaporizhia State Medical University of the Ministry of Health of Ukraine, Zaporizhia, 2020.

In the dissertation work in order to improve the biopsy diagnosis of undifferentiated (anaplastic) tumors and tumor metastases from an unknown primary source, the morphometric characteristics of "area", "perimeter" and "roundness coefficient" were investigated by processing digital micrographs of tumors of epithelial, mesenchymal, melanocyte and hemolymphocyte origin in the ImageJ program with subsequent determination of the limits of morphometric values for such categories of tumors as "small cell", "medium cell", "large cell" and separately for "small-round-blue-cells" tumors, compared with the size of normal lymphocytes; among the histopathological diagnoses of archival material retrospectively determined the percentage of categories of carcinoma verification of unknown primary localization to understand the effectiveness of an interdisciplinary approach in the diagnosis of tumors from an unknown source; immunohistochemical and morphometric characteristics for verification of favorable immunophenotypes of clinical and morphological syndrome "Cancer of unknown primary site" are formed; observations of favorable phenotypes of the clinical and morphological syndrome "Cancer of unknown primary site" with the presence of amplification of the ERBB2 gene and separate deletion of the 9p21 locus of the CDKN2A gene by FISH method and compared with the corresponding change in HER-2/neu and p16^{INK4A} protein expression were investigated by the IHC method.

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 digital morphometry of the sizes of nuclei of cells of tumors and their comparison with the sizes of usual lymphocytes of lymph nodes of a neck allowed to define objectively categories of tumors on the 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 similar undifferentiated (anaplastic) structure of tumors from the group of "small-round-blue-cellular" it is the morphometric parameters that give objective grounds to change the standard primary immunohistochemical panel [Pan CK AE1/3, Vimentin, CD45, S100 and/or HMB45] to [Pan CK AE1/3, Vimentin, CD45, S100 and / or HMB45] on more specific for "small-round-blue-cell" tumors [Pan CK AE1/3, Desmin, CD45, CD56, CD99, S100 and / or HMB45] to reduce the time and cost of diagnosis.

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 64.28% (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 carci-

noma) 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 neoplasms 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".

Observations of isolated papillary carcinomatosis in women (n = 24) after IHC were distributed in such a way that most of them – 2/3 (15 of 24; 62.5 %) had phenotypes of ovarian adenocarcinoma with a predominance of metastatic serous estrogen -dependent adenocarcinoma – 5 of 15 (33.33 %) – [CK 7 (+), CA-125 (+), CK 20 (-), ER (+), PAX-8 (+), WT-1 (+)], which according to the MPM indicators of area had probably larger cell nuclei ($p < 0.05$) compared with primary serous ovarian adenocarcinomas. The study of the hypothesis of a single source of metastatic serous "high-grade" adenocarcinomas of the peritoneum and ovaries from intraepithelial neoplasia of the fallopian tube determined a similar aberrant expression of p53 in samples of serous isolated papillary carcinomatosis, serous ovarian adenocarcinomas "high-grade" variant and intraepithelial neoplasia of the fallopian tube ($p > 0.05$), as well as their similarity in IHC profile to the distal fragments of the fallopian tubes: CK 7 strictly (+), CK 20 strictly (-), reduction of CA-125 membrane staining in the proximal fragments of the fallopian tubes, the predominance of WT-1 (+) reactions in the distal uterine tubes over the proximal ($68.7 \pm 8.12\%$ vs. $36.8 \pm 7.81\%$; $p < 0.05$). Serous isolated papillary carcinomatosis in women was characterized by loss of ER and PGR, and conversely increased expression of HER-2/neu, compared with serous ovarian AC and especially intraepithelial neoplasia of the fallopian tube, but with a significant difference only for PGR ($p < 0.05$).

The study of anonymous metastases to unilateral axillary lymph nodes in women found the majority – 22 of 29 (75.86 %) carcinomas metastases with IHC profile like breast cancer, with a predominance of the phenotype [Pan CK AE1/3 (+), CK 7 (+), ER (+), PGR (+), HER-2/neu (-), PAX-8 (-)], which had significantly smaller areas of cell nuclei ($p < 0.05$), compared with locally distributed breast carcinomas. Women with metastases to the axillary lymph nodes of the breast profile had significantly more than three-negative samples [ER-, PGR-, HER-2/neu-] ($p < 0.05$) and were significantly older (66.23 ± 11.09 vs 55.43 ± 12.19 , $p < 0.05$) compared with women in the group of primary breast cancer.

Characteristics of the CUP phenotype in men with metastatic bone lesions and elevated serum PSA levels included the predominance of metastatic carcinomas with a low degree of differentiation ($p < 0.05$), an objective reduction in the size of areas and perimeters (both $p < 0.05$), expression decreasing of acinar prostate cancer specific diagnostic IHC markers like PSA, p504s (AMACR) and AR (androgen receptors) ($p < 0.05$) compared with locally distributed prostate carcinomas. Comparison of age characteristics of these groups (50.00 ± 9.89 vs 66.00 ± 7.76 years) reliably determined a younger age in the group of bone metastases ($p < 0.05$).

Observations of CUP of colorectal cancer (CRC) profile [CK 20 (+), CDX-2 (+), CK 7 (-)] with a low degree of differentiation demonstrated clustered CK 7 (+) staining in groups of tumor cells, which due to the large percentage of such patients is female and 48.65% of the location of CRC metastases in the reproductive organs (mostly ovaries), requires supplementation of the secondary panel with IHC markers of exclusion of ovarian AC (CA-125, ER, WT-1, PAX-8). "Focal" (+) expression of p53, nuclear translocation of β -catenin ($> 30\%$) and overexpression of AMACR (++, +++) were significantly more common in CRC metastases than in primary CRC (all $p < 0.05$). Positive status of HER-2/neu (grades 2+ and 3+) was significantly more common in men with CRC metastases than in women (6 of 8; 75.0% vs 7 of 29; 24.1%; $p < 0.05$) and increased with decreasing degree of differentiation (1 of 9, 11.1% for G1; 8 of 23, 34.8% for G2; 4 of 5.80.0% for G3; $p < 0.05$). But among women, compared with men, there were more metastases of

colorectal profile with a high proliferation index for Ki-67 (23 of 29; 79.3% vs 3 of 8; 37.5%; $p < 0.05$).

Due to the significant variability of histological patterns of structure, the presence of mixed forms and atypical location, IHC takes key importance in the diagnosis of extragonadal tumors of germinogenic cells (extragonadal embryonic syndrome), including low-grade embryonic carcinomas as a phenotype of clinical and morphological syndrome "Cancer of unknown primary site". Positive expression of CD30, EMA and Pan CK AE1/3 was diagnostically significant in embryonic carcinoma samples, where MPM was approximately 2.1 times the area and 1.7 times the perimeter of normal lymphocytes ($p_{ar} < 0.05$, $p_{pr} < 0.05$), in contrast to seminomas/germinomas, in which the PLAP and CD117 markers showed the highest expression and the MPM values were more than three times the area and twice the perimeter larger than normal lymphocytes ($p_{ar} < 0.05$, $p_{pr} < 0.05$), and yolk sac tumors with a positive status for α FP (+) and MPM indicators, which are more than 1.7 times in area and 1.5 in perimeter higher than normal lymphocytes ($p_{ar} < 0.05$, $p_{pr} < 0.05$).

Examination of samples of anonymous metastases to the lymph nodes of the neck revealed about half – 35 of 62 (56.45 %) of metastases of squamous cell carcinoma (SCC) with IHC profile similar to the group of SCC of the head and neck of known localizations with the predominance phenotype [Pan CK AE1/3 (+), CK HMW (+), p63 (+), CK 20 (-), TTF-1 (-), Vimentin (-/+), CK 7 (-/+)]. The marker p16^{INK4A} in primary SCC was negative (intranuclear reactions of single cells) in SCC of the larynx, facial skin and lower lip and positive (mixed nuclear-cytoplasmic reaction of clusters of "blocks" of cells) in 8 of 14 (57.14%) SCC of the oropharynx and in 4 of 10 (40.00%) SCC of the maxillary sinus. In the group of SCC metastases were found only 3 of 35 (8.57%) p16^{INK4A} (+) observations (2 women and 1 man), which suggested the origin of these SCC from the oropharynx or maxillary sinus. Indicators of digital photometry of the area, perimeter and roundness coefficient of SCC metastases in the lymph nodes of the neck compared with primary SCC of the head and neck, showed that the cell nuclei were signifi-

cantly smaller by area ($p < 0.05$) and more elongated and polymorphic ($p < 0.05$), which corresponds to low-differentiated histological forms, which among metastatic SCC accounted for 16 of 35 (45.71%).

Anonymous metastases of SCC to the inguinal lymph nodes from all inguinal adenopathies accounted for: in women 57.14% (4 of 7), in men 25.00% (1 of 4). All metastases of SCC showed the phenotype [CK HMW (+), p63 (+), p16^{INK4A} ("+" for women, "-" for men)]. Metastatic SCC in women and men had significantly smaller areas and perimeters of cell nuclei (both $p < 0.05$) compared with primary SCC of the cervix in women and genitals in men, but similar roundness coefficients ($p > 0.05$).

From the group of neuroendocrine tumors (NET) without positive organ-specific reactions (50 of 107; 46.73%) the group of low-differentiated (G3) neuroendocrine carcinomas (NEC) (31 of 50; 62.00%) was separated as a phenotype of clinical and morphological syndrome "Cancer of unknown primary site", who had a significantly higher proliferation index than NET with G1 and G2 (35.4 ± 17.35 vs 13.0 ± 0.72 ; $p < 0.05$). Comparison of digital morphotometry data and proliferation index of metastatic NEC (G3) without organ-specific features as a phenotype syndrome "Cancer of unknown primary localization" with small cell NEC (G3) of the lung found a significant Ki-67 ($p < 0.05$). Instead, metastases of NEC (G3) with immunophenotype [Pan CK AE1/3 (+), Vimentin (-), Chromogranin A (+/-) and/or Synaptophysin (+/-) and/or CD56 (+), CK 20 (-), CK 7 (+), TTF-1 (+)] and probable origin from the lungs due to TTF-1 (+) such a difference was not found (all $p > 0.05$). Observations of CUP can be interpreted as carcinoma metastases from Merkel cells if they exhibit the phenotype [Pan CK AE1/3 (paranuclear +), CK 20 (paranuclear +), Chromogranin A (+/-) and/or Synaptophysin +/-], and also have nuclei, the area and perimeter of which correspond to the category of "small-round-blue-cells" tumors (all $p > 0.05$).

From the 61 cases of CUP, IHC expression of p16^{INK4A} was positive in 31 observations (51.4 %), which in the FISH study showed 28 (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 axillary lymph nodes; metastasis of poorly differentiated NEC and AC with a profile of CRC. 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^{INK4A} / CDKN2A), which is probably universal in the acquisition of invasive and aggressive carcinomas of different localizations.

Scientific novelty. For the first time, objective diagnostic ranges of MPM parameters of area, perimeter and roundness coefficient of nuclei were determined for "small cell tumors", "medium cell tumors", "large cell tumors" and separately for "small-round-blue-cell tumors" compared with the size of normal lymphocytes in the digital image processing program ImageJ. New data were obtained on the objective parameters "area", "perimeter" and "roundness coefficient" of cell nuclei of metastatic tumors of different histogenesis, verified by IHC. The only source of serous papillary carcinomatosis in women with immunophenotype [CK 7 (+), CA-125 (+), CK 20 (-), ER (+), PAX-8 (+), WT-1 (+), p16^{INK4A} (+), p53 (+)] and serous AC of the ovary of the "high-grade" variant from the distal fragments of the fallopian tube was confirmed, which allows to exclude it from the clinical and morphological syndrome "Cancer of unknown primary site". Extended scientific understanding of age, gender, histological, IHC and MPM features of favorable immunophenotypes of clinical and morphological syndrome " Cancer of unknown primary site " to understand the unique biology of primary disseminated carcinomas, compared with locally distributed ones. Studies on the correspondence of changes in epidermal growth factor HER-2/neu expression to ERBB2 gene amplification and p16^{INK4A} oncoprotein expression to deletion of the 9p21 locus of the CDKN2A gene in metastatic CUP have been further developed.

Practical meaning. To improve the quality and speed of verification of undifferentiated (anaplastic) tumors and tumor metastases from unknown primary sources, a diagnostic algorithm was optimized: it was proposed to perform IHC at the stage of analysis of sections stained with hematoxylin and eosin, using digital MPM using the ImageJ program. When determining the values of MPM parameters of "small-round-blue-cell tumors" (30 - 45 μm^2 in area, 25 - 35 μm in perimeter and 0.75 - 0.90 in roundness) it is recommended 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], which immediately covers most nosological units of this category of tumors. IHC and MPM characteristics of nine favorable immunophenotypes of the CUP syndrome, according to which they can be treated as potentially curable disseminated forms of CUP, have been elucidated. The greater accuracy of the FISH method in the diagnosis of 9p21 / CDKN2A deletion and ERBB2 amplification has been proved, compared with the iHC method, which determines them not directly but through the products of nuclear cytoplasmic expression of p16^{INK4A} and membrane overexpression of HER-2/neu, respectively. According to the results of the research, the share of metastatic tumors of the third category of verification "confirmed CUP" significantly exceeds the world indicators (21.95% vs. 3-5%), which raises the practical issue of interdisciplinary communication and quality of patient examination at the "pre-biopsy stage". Ukraine's patent № 111478 for a utility model and an information letter № 68-2019 on innovations in the health care system for the development of "Method for predicting metastases of squamous cell carcinoma of the larynx." were obtained.

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

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ АВТОРОМ ПРАЦЬ НА ТЕМУ 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 дослідження 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» неопластичних 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 цифрової МФМ й статистична обробка результатів)*.

9. Морфометричний аналіз «панцитокератин-негативних» неопластичних 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 цифрової 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 цифрової 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 ІГХ, цифрової МФМ 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, цифрової морфометрії й статистична обробка результатів)*.

13. Ізольований канцероматоз черевної порожнини у жінок: особливості імунотипів 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, цифрової морфометрії 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, проведення ІГХ, цифрової морфометрії 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^{INK} 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 інтерпретація 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 та дизайн 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, відбір та аналіз архівного матеріалу, проведення ІГХ, цифрової морфометрії, 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, статистичний аналіз 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.- практи. 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, статистичний аналіз 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 та дизайн дослідження, статистичний аналіз 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, проведення ІГХ, МФМ, статистичний аналіз даних)*.

29. Savchenko O., Poslavska O., Savchenko P. Carcinose papillaire abdominale 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, систематизація архівного матеріалу, проведення ІГХ, МФМ, 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, статистична обробка результатів)*.

31. Пославська О. В., Савченко П. В. Особливості карцином невідомої первинної локалізації з ізольованим одностороннім ураженням пахвових лімфатичних вузлів у жінок. *Сьогодення біологічної науки: II Міжнародна наукова конференція (м. Суми, 9-10 листопада 2018 р.)*. Суми, 2018. С. 229-232. *(Дисертанту належить ідея та дизайн дослідження, систематизація архівного матеріалу, проведення ІГХ, МФМ, 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 2018 р.)*. Полтава, 2018. С. 37-38. *(Дисертанту належить ідея та дизайн дослідження, систематизація архівного матеріалу, проведення ІГХ та МФМ, статистична обробка результатів)*

33. Пославська О. В. Ізольовані метастази кісток у чоловіків із підвищенням сироваткового маркера 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 2018) 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`etude 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, 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 практи-*

ка 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, 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).*

ЗМІСТ

Перелік умовних позначень, символів, скорочень і термінів	31
Вступ	33
Розділ 1 Огляд літератури	43
1.1 Загальна характеристика поняття низькодиференційовані або анапластичні пухлини, діагностичні підходи	43
1.2 Злоякісні дрібно-кругло-синьо-клітинні пухлини	46
1.3 «Великоклітинні» недиференційовані пухлини, проблеми діагностики клініко-морфологічного синдрому «Рак невідомої первинної локалізації»	57
1.4 Характеристика метастатичних карцином сприятливих фенотипів клініко-морфологічного синдрому «Рак невідомої первинної локалізації»	62
1.4.1 Низькодиференційована карцинома з розподілом по середній лінії тіла (екстрагонадний зародково-клітинний синдром)	63
1.4.2 Жінки з ізольованим папілярним канцероматозом очеревини	65
1.4.3 Жінки з метастазами карциноми в ізольовані аксилярні лімфатичні вузли	69
1.4.4 Ізольовані метастази плоскоклітинної карциноми в лімфатичні вузли шиї	70
1.4.5 Ізольована пахова аденопатія з метастазом плоскоклітинної карциноми	72
1.4.6 Низькодиференційована нейроендокринна карцинома	73
1.4.7 Чоловіки з метастазами аденокарциноми кісток і підвищеним показником сироваткового PSA	75
1.4.8 Аденокарцинома з імунoproфілем товстої кишки	76
1.4.9 Аденопатія з клітин Меркеля без первинного джерела	78
Розділ 2 Матеріали та методи дослідження	81

2.1	Матеріали дослідження	81
2.2	Методи дослідження	86
Розділ 3	Оптимізація імуногістохімічних алгоритмів верифікації походження метастатичних пухлин шляхом морфометричного дослідження ядер клітин пухлин різного гістогенезу	96
3.1	Морфометричне дослідження [Pan CK AE1/3 позитивних] метастазів пухлин невідомої первинної локалізації в лімфатичні вузли шиї – імунофенотипи метастатичних карцином	99
3.2	[Pan CK AE1/3 негативні (-), Vimentin позитивні (+)] метастази пухлин невідомої первинної локалізації в лімфатичні вузли шиї: варіанти імунофенотипів, морфометричне дослідження	111
Розділ 4	Розподіл гістологічних варіантів, імуногістохімічні особливості та морфометричне дослідження сприятливих фенотипів аденокарцином клініко-морфологічного синдрому «Рак невідомої первинної локалізації»	128
4.1	Жінки з ізольованим папілярним канцероматозом очеревини	128
4.1.1	Порівняння імуногістохімічних та морфометричних характеристик ізольованого папілярного канцероматозу у жінок в якості фенотипу клініко-морфологічного синдрому «Рак невідомої первинної локалізації» та первинних пухлин яєчників	129
4.1.2	Дослідження інтраепітеліальної неоплазії епітелію маткової труби, як можливого джерела походження ізольованого папілярного канцероматозу з фенотипом серозної «high-grade» аденокарциноми яєчника	140
4.2	Жінки з метастазами карциноми в ізольовані аксиллярні лімфатичні вузли	146
4.2.1	Розподіл фенотипів і порівняння морфометричних показників метастатичних карцином в аксиллярні лімфатичні вузли та первинних пухлин молочної залози	146

4.2.2 Розподіл фенотипів метастатичних та первинних карцином молочної залози за комбінаціями прогностичних маркерів «золотого стандарту» [ER, PGR, HER-2/neu]	149
4.3 Чоловіки з метастазами аденокарциноми кісток і підвищеним показником сироваткового PSA	151
4.4 Аденокарцинома з профілем товстої кишки	156
4.4.1 Розподіл локалізацій ураження, порівняння морфометричних та імуногістохімічних характеристик метастатичних та первинних карцином колоректального фенотипу	157
4.4.2 Прогностичні імуногістохімічні маркери метастатичних та первинних карцином колоректального фенотипу	159
Розділ 5 Морфометричні та імуногістохімічні особливості сприятливих неаденогенних фенотипів клініко-морфологічного синдрому «Рак невідомої первинної локалізації»	164
5.1 Низькодиференційована карцинома з розподілом по середній лінії тіла (екстрагональний зародково-клітинний синдром)	164
5.1.1 Порівняння імунофенотипів екстрагональних та місцево-розповсюджених пухлин з герміногенних клітин	166
5.1.2 Морфометрична характеристика окремих типів пухлин з герміногенних клітин в програмі ImageJ	169
5.2 Ізольовані метастази плоскоклітинної карциноми шийних лімфатичних вузлів	170
5.2.1 Порівняння імуногістохімічного профілю метастазів карцином невідомих первинних локалізацій в лімфатичні вузли шиї з характеристиками плоскоклітинних раків голови та шиї	173
5.2.2 Морфометрична характеристика первинних плоскоклітинних карцином голови та шиї та підгруп метастатичних карцином в лімфатичні вузли шиї	176
5.3 Ізольована пахова аденопатія (метастаз плоскоклітинного раку)	178

5.3.1 Дослідження імуногістохімічних та морфометричних характеристик ізольованої пахові аденопатії у жінок	179
5.3.2 Дослідження імуногістохімічних та морфометричних характеристик ізольованої пахові аденопатії у чоловіків	182
5.4 Низькодиференційована нейроендокринна карцинома	184
5.4.1 Визначення імуногістохімічних та морфометричних характеристик нейроендокринних пухлин без первинних локалізацій	185
5.4.2 Особливості TTF-1 позитивних пухлин легенів, порівняння морфометричних характеристик низькодиференційованих нейроендокринних карцином невідомого походження з первинними дрібноклітинними карциномами легень	192
5.5 Аденопатія з клітин Меркеля з невідомого джерела	200
Розділ 6 Особливості експресії імуногістохімічних маркерів p16 й Her-2/neu та зміни відповідних генів в сприятливих фенотипах клініко-морфологічного синдрому «Рак невідомої первинної локалізації»	206
Розділ 7 Аналіз та узагальнення результатів дослідження	221
Висновки	241
Практичні рекомендації	246
Список використаних джерел	248
Додаток А Акти впровадження	285
Додаток Б Наукові праці, опубліковані за темою дисертації	299
Додаток В Відомості про апробацію результатів дисертації	307

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

- АК – аденокарцинома
- АКЯ – аденокарцинома яєчника
- АЛВ – аксиллярні лімфатичні вузли
- ДКСП – дрібно-кругло-синьо-клітинні пухлини
- ЕПГК – екстрогонадні пухлини з герміногенних клітин
- Зб. – збільшення
- ЗЛ – звичайні лімфоцити
- ЗН – злоякісне новоутворення
- ІГХ – імуногістохімічне (дослідження)
- ІЕН – інтраепітеліальна неоплазія
- ІП – індекс проліферації
- ІПК – ізольований папілярний канцероматоз
- ККМ – карцинома з клітин Меркеля
- КРР – колоректальний рак
- ЛВШ – лімфатичні вузли шиї
- МЗ – молочна залоза
- МІ – мітотичний індекс
- МКХ-10 – міжнародна класифікація хвороб 10 перегляду
- МФМ – морфометричне (дослідження)
- МТ – маткова труба
- НЕП/НЕК – нейроендокринна пухлина/нейроендокринна карцинома
- ПГК – пухлини з герміногенних клітин
- ПЗ – передміхурова залоза
- ПЖМ – пухлина жовткового мішку
- ПЛВ – паховий лімфатичний вузол
- ПР – плоскоклітинний рак
- РНПЛ – раки невідомої первинної локалізації

я/к – ядра клітин

AMACR – alpha-methylacyl-CoA racemase

AR – androgen receptors (андрогенові рецептори)

CA-125 – carbohydrate antigen 125 (mucin 16)

CDX-2 – caudal type homeobox 2

CGA - Chromogranin A

CK – cytokeratin

CK HMW – cytokeratin high molecular weight

CUP – cancer of unknown primary site

ER – estrogen receptors (рецептори до естрогенів)

ETGC – extragonadal tumors of germinogenic cells

FISH – Fluorescence in situ hybridization (флюоресцентна гібридизація in situ)

HCG – human chorionic gonadotropin

HER-2/neu – human epidermal growth factor receptor-2

IHC – immunohistochemical investigation

IPC – isolated papillary carcinomatosis

MPM – morphometric investigation

PAX-8 – paired box 8

PGR – progesterone receptors (рецептри до прогестеронів)

PLAP – placental alkaline phosphatase

PNET – примітивна нейроектодермальна пухлина

PSA – prostate-specific antigen (простат-специфічний антиген)

SYN – synaptophysin

TTF-1 – thyroid transcription factor - 1 (транскрипційний фактор щитоподібної залози 1)

WT-1 – Wilms tumor protein – 1

α FP – alpha fetoprotein

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Найвагомішу частку недиференційованих (анапластичних) пухлин з труднощами верифікації джерела походження складають метастатичні карциноми. Це гетерогенна група злоякісних пухлин епітеліального гістогенезу, походження яких залишається невизначеним 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 [1-5]. За таких обставин, пацієнти з РНПЛ мають поганий клінічний прогноз з обмеженою тривалістю життя. Середній термін виживання пацієнтів з діагнозом РНПЛ складає вісім місяців при метастазах, що вражають лише регіональні лімфатичні вузли, і не більше трьох місяців при екстранодальній дисемінації [6-9].

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. Ці потенційно курабельні варіанти враховують не тільки імуноморфологічні характеристики (гістологічний варіант пухлини та імунотип), але й клінічні дані: вік, стать, лабораторні аналізи, локалізацію метастазів за даними УЗД, КТ, МРТ, тощо. Так формується уявлення про можливий прогноз фенотипу клініко-морфологічного синдрому РНПЛ. Наприклад, жінки із АК, що вражає виключно аксилярні лімфатичні вузли, або чоловіки із метастазами кісток та підвищенням сироваткового PSA мають кращі прогнози, ніж пацієнти з метастазами карцином в печінку [10-15].

Австралійський Національний інститут з догляду за здоров'ям (National Institute for Health and Care Excellence) розробив корисну класифіка-

цію РНПЛ за категоріями верифікації. Категорія 1 звучить як "злоякісні пухлини невідомого походження", де діагноз визначається тільки на підставі даних клінічного обстеження. Категорія 2 – "попередній РНПЛ" виставляється після рутинного морфологічного дослідження, і залишається як діагноз у випадку анапластичної будови метастатичної карцином і відсутності клінічних проявів первинного джерела. І тільки остання категорія 3, саме "підтверджений РНПЛ", вважається дійсно первинно-дисемінованою пухлиною, коли навіть ІГХ метод не допомагає визначитись з джерелом походження [10]. В Україні серед людей похилого віку, на жаль, 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 (немає таких статистичних показників), отримуючи «незрозумілий» діагноз пацієнт вимагає пояснень, це рідка пухлина синдрому РНПЛ чи недоліки обстеження, що потребує аналізу діагностичних заходів та їх результативності.

Багато робіт закордонних науковців останніх років присвячені проблемі клініко-морфологічного синдрому «РНПЛ», так званих 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 [16-19]. 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 [20]. 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.

Мета і завдання дослідження. Мета – 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.

Для досягнення поставленої мети були поставлені наступні **задачі**:

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 однобічні 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 карциномами товстої кишки.

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 шиї й, окремо, в пахові лімфатичні вузли, як імунофенотипів клініко-

морфологічного синдрому «Рак невідомої первинної локалізації», в порівнянні з первинними плоскоклітинними раками голови та шиї 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^{INK4A}, 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 гіб-

ридизації *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 [СК 7 (+), СА-125 (+), СК 20 (-), ER (+), PAX-8 (+), WT-1 (+), p16INK4A (+), p53 (+)] та серозної аденокарциноми яєчників варіанту «high-grade» з інтраепітеліальною неоплазією 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 p16INK4A до делеції локусу 9p21 гену CDKN2A в метастатичних карциномах невідомої первинної локалізації.

Практичне значення отриманих 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 мкм² 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 і/або НМВ45] на [Pan CK AE1/3, Desmin, CD45, CD56, CD99, S100 і/або НМВ45], 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 p16INK4A 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 здобувача. 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 p16INK4A, 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 засіданні кафедр патологічної анатомії і судової медицини, гістології, медичної біології, фармакогнозії та ботаніки, клі-

нічної анатомії, анатомії і оперативної хірургії ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України» 18.06.2020 р.;

а також 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 2018р.); III International scientific and practical conference «*Scientific Research Priorities: theoretical and practical value*» (Nowy Sacz, Poland, 27-30 листопада 2018р.); 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 клініч-*

ній практиці лікаря» (м. Вінниця, 10-11 квітня 2019 р.); 3 Colloque international francophone en Ukraine «*Langues, Sciences et Pratiques*» (м. Одеса, 3-4 жовтня, 2019р.); Третій всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «*Теорія та практика сучасної морфології*» (м. Дніпро, 9-11 жовтня 2019 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.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Загальна характеристика поняття «недиференційовані або анапластичні пухлини», діагностичні підходи

Пацієнти, що мають діагноз «недиференційована пухлина» або «пухлина невідомої первинної локалізації», часто на самому початку демонструють збільшення лімфатичних вузлів або утворення черевної порожнини / малого тазу, тобто складають когорту онкологічних хворих з неспецифічною клінічною маніфестацією. В таких випадках знахідка під час біопсії недиференційованих (анапластичних) клітин не звужує, а навпаки розширює план клінічного обстеження пацієнта та викликає необхідність проведення додаткового імуногістохімічного дослідження (ІГХ) з метою з'ясування органа / тканини походження пухлинного процесу.

В розумінні терміну «недиференційована пухлина» є деякі розбіжності. Серед фахової літератури нами було знайдено досить точні визначення від авторів Armita Bahrami із співавт. (2008), що «недиференційованими пухлинами» можна вважати неоднорідну групу новоутворень з слабкими ознаками диференціації чи їх повною відсутністю на рівні рутинного мікроскопічного дослідження; або, «недиференційована пухлина» є метастазом невідомого походження або первинною неоплазією без явної клітинної лінії диференціювання [21]. Але, інші морфологи пов'язують цей термін з гістологічно недиференційованими пухлинами, що не можуть бути класифіковані із застосуванням також і додаткових методів – імуногістохімії та / або FISH [22-23]. В такому контексті, маються на увазі високо злоякісні пухлини та їх метастази, що зазвичай пов'язані з плеоморфною та анапластичною зовнішністю.

Нездатність ідентифікувати первинний осередок анапластичної (недиференційованої) пухлини створює багато проблем, тому що локалізація зазвичай диктує загальний прогноз та очікувані результати від лікування для

пацієнтів. Невизначеність викликає тривогу серед медперсоналу через відчуття, що проведена діагностика була неповною. На практиці недиференційовані (анапластичні) пухлини зустрічаються у вигляді окремих або множинних метастазів в лімфатичні вузли (N) або у віддалені ділянки тіла (M) з невідомим (T), і маркуються як N1-3 - регіональний метастаз, M1 – віддалений метастаз, Mx – кількість метастазів неможливо оцінити.

МКХ-10 має декілька рубрик для невизначених злоякісних новоутворень (ЗН), як неточно позначених, вторинних та не уточнених локалізацій (C76-C80) [24]:

C76 – ЗН інших та неточно позначених локалізацій;

C77 – вторинне і не уточнене ЗН лімфатичних вузлів;

C78 – вторинне ЗН органів дихання та травлення;

C79 – вторинне ЗН інших локалізацій;

C80 – ЗН без уточнення локалізації;

C97 – ЗН самостійних (первинних) множинних локалізацій, що можуть симулювати метастази і викликати бажання пошуку первинного джерела.

В таких випадках для вибору методу терапії, в першу чергу, важливо визначити гістогенез ЗН: епітеліальне, мезенхімальне, меланоцитарне чи гематолімфоїдне [25-28].

Морфологічні ознаки при анапластичних пухлинах часто мають типові малюнки епітеліальної або мезенхімальної будови, і це може підказати напрямок подальшого ІГХ. Так звана «епітеліоїдна будова» демонструє епітеліоїдні круглі або овальні клітини, що розташовані гніздами; характерною ознакою також є наявність десмопластичної стромальної реакції (відокремлення осередків пухлинних клітин сполучною тканиною з судинами). На відміну, «мезенхімальна будова» характеризується наявністю веретеноподібних клітин, без реакції строми, з окремими судинами між пухлинними клітинами. Але ці класичні прояви будови не характерні для ряду пухлин: меланоми, лімфоми, нейроендокринних пухлин, саркоматоїдної карциноми та, навпаки, саркоми з епітеліоїдними компонентами [21-22].

Стандартні діагностичні ІГХ алгоритми включають первинну панель з розподілом недиференційованих пухлин на чотири категорії: епітеліальні, мезенхімальні, меланоцитарні та гемолімфоцитарні пухлини.

Епітеліальні пухлини виявляють позитивність до цитокератинів з різною молекулярною вагою (часто використовують так звані «коктейлі» з кератинів, наприклад САМ 5.2 із суміші СК 8, СК 18 та СК 19 або панкератин 35ВН11 (Pan СК АЕ1/3)), та до епітеліального мембранного антигену – муцину 1 типу (ЕМА). За даними Bahrami A. із співавт. (2008) використання разом САМ 5.2 та ЕМА дозволяє ідентифікувати до 99 % недиференційованих епітеліальних пухлин [21].

Мезенхімальні пухлини містять в цитоплазмі проміжний філамент віментин та виявляють позитивність до однойменного ІГХ маркеру Vimentin, але складність полягає в низькій специфічності цього маркеру (позитивними до Vimentin є також лімфоми, меланоми та деякі карциноми). Наприклад, ко-експресію цитокератинів та віментину демонструють нирково-клітинна карцинома, ендометріальна аденокарцинома (АК), серозна АК яєчників, папілярна та анапластична карциноми щитоподібної залози, мезотеліома, карциносаркома, саркоматоїдна карцинома тощо [25-29].

Меланоцитарні пухлини зазвичай верифікують завдяки маркерам S100 та НМВ-45. Перевагу віддають більш специфічному НМВ-45 (90-100 %), що є негативним в карциномах, саркомах та лімфомах. Скринінговим маркером первинної панелі для лімфом залишається пан-лейкоцитарний антиген CD45, що за даними літератури має високу чутливість (до 97 %) та специфічність (біля 100 %) [21-22, 25].

Подібність гістологічних характеристик різних тканин, що втратили диференціацію, дозволяє їх розподілити приблизно «на око» за розміром та формою ядер на дрібно-кругло-синьо-клітинні пухлини (ДКСП) та великоклітинні пухлини, останні в свою чергу діляться на карциномо-подібні, саркомо-подібні та пухлини з мішаними характеристиками [30-31].

1.2 Злоякісні дрібно-кругло-синьо-клітинні пухлини

Злоякісні ДКСП (англійською - small round blue cell tumors) входять у групу високо агресивних неоплазій, що утворені відносно невеликими однорідними недиференційованими клітинами із підвищеним ядерно-цитоплазматичним співвідношенням та мають дещо більший або подвійний розмір еритроцитів у мазках, висушених на повітрі. Морфологічна діагностика цієї категорії пухлин є особливо важкою через їх недиференційований або примітивний характер. Класифікація базується на декількох принципах. Наводимо ті, що в літературі описані частіше [30-35]:

- *на основі патернів (малюнків) морфологічної будови:*

(1) дифузні дрібно-кругло-клітинні малюнки: саркома Юінга, примітивна нейроектодермальна пухлина (PNET), карцинома з клітин Меркеля (ККМ), ембріональна рабдоміосаркома, дрібноклітинний рак, лімфома, меланома;

(2) розподілені на дольки дрібно-кругло-клітинні малюнки: Саркома Юінга, альвеолярна рабдоміосаркома;

(3) альвеолярні / псевдоальвеолярні дрібно-кругло-клітинні малюнки (ця закономірність включає осередкову, погану згуртованість клітин, що призводить до появи псевдоальвеолярної форми): альвеолярна рабдоміосаркома, примітивна нейроектодермальна пухлина;

(4) дрібно-кругло-клітинні малюнки з розетками (розетка – як квітка, клітини розташовані радіально навколо центральної ділянки):

➤ справжні розетки Флекснера (Flexner's, також їх називають Flexner – Winterstein), що містять чітко окреслений порожній центральний просвіт (нейробластома, примітивна нейроектодермальна пухлина);

➤ розетки Homer-Wright, їх центр не має просвіту, а має рясний фібрилярний матеріал (нейробластома);

➤ псевдорозетки, розетки типу Homer-Wright, центр яких має судину (примітивна нейроектодермальна пухлина);

(5) дрібно-кругло-клітинні малюнки з гемангіоперицитоматозним судинним малюнком: синовіальна саркома, мезенхімальна хондросаркома;

(6) дрібно-кругло-клітинні малюнки з іншими компонентами: псевдозалоци — низько-диференційована синовіальна саркома, хрящ - мезенхімальна хондросаркома;

- *за розміром клітин:*

(1) дрібні круглі клітини - примітивна нейроектодермальна пухлина, саркома Юінга, меланома, рабдоміосаркома, клітинна хвороба Лангерганса, лімфома, НЕК, ККМ, нюхова нейробластома;

(2) відносно великі круглі клітини - меланома, рабдоміосаркома, лімфоїдні пухлини, парагангліома, низькодиференційовані ПР та АК;

- *за походженням:*

(1) нейрогенне походження: саркома Юінга / примітивна нейроектодермальна пухлина, нейробластома, ретинобластома, медуллобластома, парагангліома, НЕК, ККМ;

(2) епітеліальне походження: недиференційований рак, ПР, АК;

(3) мезенхімальне походження: міогенна диференціація – ембріональна та альвеолярна рабдоміосаркоми, остеїдна – дрібноклітинна остеосаркома, хондроїдна - мезенхімальна хондросаркома, диференціювання за типом жирової тканини – міксоїдна / круглоклітинна ліпосаркома;

(4) гематолімфоїдне походження: лімфоми;

(5) злоякісні пухлини м'яких тканин невизначеного типу: десмопластична дрібноклітинна пухлина, низькодиференційована синовіальна саркома;

- *за кількістю цитоплазми:*

(1) маленькі сині круглі клітини з мізерною цитоплазмою: саркома Юінга, нейробластома тощо;

(2) відносно великі, сині або "рожеві" круглі клітини з круглими ядрами та рясною еозинофільною цитоплазмою: плазмоцитома, анапластична

великоклітинна лімфома, рабдоміосаркома (переважно в м'яких тканинах) тощо.

Як видно, морфологія залишається початковим моментом, який допомагає визначити перелік ІГХ маркерів або інших допоміжних тестів для верифікації конкретного випадку ДКСП. Проте складнощі супроводжують весь діагностичний процес, в тому числі і ІГХ. Так, наприклад, до ДКСП з коекспресією Vimentin та СК, що може заплутати дослідника, відносяться десмопластична дрібноклітинна пухлина, епітеліоїдна ангіосаркома, епітеліоїдна саркома, екстрауретральна рабдоїдна пухлина, залозиста шваннома, злоякісна пухлина оболонки периферичного нерва (зрідка), метастатична карцинома окремих локалізацій, епітеліоїдна саркома проксимального типу, синовіальна саркома [21].

Більшість ДКСП відносяться до групи м'якотканинних пухлин, що часто з метою точної діагностики вимагають FISH (Fluorescence in situ hybridization) – методу для знаходження конкретної хромосомної аномалії. Наприклад, родина сарком Юінга має таке визначення – це CD99 позитивні пухлини, що містять характерні транслокації в 22q12, або всі пухлини, що демонструють транслокацію $t(X; 18; p11; q11)$ відносяться до низькодиференційованої синовіальної саркоми, не залежно від первинної локалізації. В таблиці 1.1 згруповані характеристики найбільш розповсюджених м'якотканинних ДКСП.

Треба зазначити, що ІГХ метод діагностики м'якотканинних ДКСП має в своєму арсеналі досить низькоспецифічні маркери (наприклад, CD99 / MIC2 окрім саркоми Юінга також позитивний у випадках лімфобластної лімфоми, низькодиференційованої синовіальної саркоми, мезенхімальної хондросаркоми та меланоми, якщо називати лише кілька пухлин; Vimentin взагалі присутній у всіх пухлинах мезенхімального походження), що значно розширює ІГХ панель через той факт, що діагноз буде базуватися на поєднанні позитивних та негативних результатів (рис. 1.1).

Таблиця 1.1 – Характеристики дрібно-кругло-синьо-клітинних пухлин м'яких тканин та кісток

Назва ДКСП (англомовні назви, синоніми)	Діагностичні критерії	Морфологічні особливості	ІГХ, FISH
1	2	3	4
<p>Саркома Юінга / примітивна нейроектодермальна пухлина [30-36]</p> <p>Ewing sarcoma / Primitive neuroectodermal tumor (PNET), Peripheral Primitive Neuroectodermal Tumor, Peripheral neuroectodermal tumor, Askin tumor, Peripheral neuroepithelioma.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Друга після остеосаркоми вражає кістки дітей та юнаків (80 % пацієнтів молодше 20 років); • 10-20 % позаскелетне розташування; • Ч:Ж як 1,4:1; • високий МІ (5-50 / 10 ПЗ з $\times 400$); • CD99 (+) у > 90 % випадків. 	<ul style="list-style-type: none"> • Дрібні клітини з круглими або овальними ядрами, гладкою ядерною мембраною та нижнім хроматином; • глікоген цитоплазми клітин присутній у 75-90 % випадків; • присутні розетки Flexner-Winterstein, Homer-Wright або псевдорозетки; • може утворювати альвеолярні або ангіоматозні структури. 	<ul style="list-style-type: none"> • MIC2 / CD99 (+) (дифузна, змішана експресія), NKX2.2, Flil, кавеолін разом з CD45 (-); • 85 % мають хромосомну транслокацію, t(11; 22)(q24; q12), яка зливає EWSR1 з FLil для онкопротеїну EWSR1-Flil.
<p>Міксоїдна ліпосаркома [30-31, 37-39]</p> <p>Cellular myxoid liposarcoma, Round cell liposarcoma</p>	<ul style="list-style-type: none"> • В глибоких м'яких тканинах кінцівок, > 2/3 біля м'язів стегна; • метастазує в незвичайні місця і може бути множинною; • зазвичай не має ядерного плеоморфізму, гігантських клітин; • низький МІ. 	<ul style="list-style-type: none"> • Суміш неліпогенних клітин овальної форми та малих перстнеподібних ліпобластів у міксоїдній стромі; • клітинність на периферії часточок; • багата капілярна сітка - «куряча сітка»; • позаклітинний муцин утворює великі озера - мікроцистна лімфангіома "легеневий набряк". 	<ul style="list-style-type: none"> • S100 мінливо позитивний у високозлоякісному компоненті; • <5 % на MDM2 та CDK4; • хромосомна транслокація t(12; 16)(q13; p11) або t(12; 22)(q13; q12)

Продовження таблиці 1.1

1	2	3	4
<p>Десмопластична дрібно-клітинна пухлина [40-43]</p> <p>Desmoplastic small cell tumor, Desmoplastic small round cell tumor, Intraabdominal desmoplastic small round cell tumor, Small cell tumor with desmoplastic stroma</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Кератин і десмін позитивна; • вражає дітей та юнаків; • Ч більше Ж (пік захворюваності в третій декаді); • в черевній порожнині, в заочеревинному просторі, тазу, сальнику та брижі у вигляді серозних імплантатів; • високий МІ. 	<ul style="list-style-type: none"> • Гнізда та шнури клітин, оточених десмопластичною стромою; • розетки Homer-Wright; • уніфіковані клітини, діаметром 15-20 мкм, ядра рівномірні, круглія, щільний хроматин, непомітні ядерці; • може містити круглі парануклеарні еозинофільні вclusions (рабдоїд), як веретено. 	<ul style="list-style-type: none"> • CAM5.2 90 % • AE1/3 70 % • Desmin (“dot like” паттерн) 80-90 % • NSE 100 % • EMA 88 % • WT1 70-100 % • CD99 • t (11; 22) (p13; q12) 95-100 %, отримання химерного продукту плавлення EWS-WT-1
<p>Рабдоміосаркома [30-32, 44-46].</p> <p>Підтипи:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ембріональна • Альвеолярна • Змішана • Склерозуюча • Плеоморфна <p>Rhabdomyosarcoma</p> <p>Embryonal (includes botryoid, spindled), Alveolar, Mixed, Sclerosing, Pleomorphic</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Ембріональна - найпоширеніший підтип; • 1/2 в межах голови та шиї, 1/2 - в сечостатевої системі, 9 % кінцівки; • найпоширеніша саркома м'яких тканин дитячого віку (до 10 % усіх дитячих злоякісних новоутворень) • Лише склерозуючі та плеоморфні типи виявляють значну захворюваність у дорослих. 	<ul style="list-style-type: none"> • Ембріональна: різний ступінь клітинності, чергування щільно упакованих гіперцелюлярних ділянок і міксоїдних областей; суміш недиференційованих гіперхромних клітин круглої або веретеноподібної форми та різної кількості рожевих рабдоміобластів. • Альвеолярна: великі агрегати незрілих круглих або овальних клітин, які мають центральну втрату клітинної згуртованості та утворення різних альвеолярних просторів. 	<ul style="list-style-type: none"> • Експресія міогеніну є діагностичною Myogenin (+), MyoD (+), MSA (+), Desmin (+), GFAP (-), Keratin (-), EMA (-), CD68 (-); Ембріональна: Синдром Костелло (мутації генів HRAS), нейрофіброматоз 1 (мутації генів NF1) синдром Ноонана (мутації у кількох генах) Альвеолярна: транслокації t(2;13)(q35;q14), t(1 ; 13)(p36;q14),

Продовження таблиці 1.1

1	2	3	4
		Клітини на їх периферії прилягають в один шар до волокнистої перетинки, тоді як клітини в центрі - вільно розташовані.	продукти злиття гени PAX3-FOXO1 PAX7-FOXO1.
<p>Нейробластома [30-32, 47-49].</p> <p>Neuroblastoma</p> <p>Має сім підтипів за ступенем дозрівання нейробластів та кількістю фонової шванновської стромы.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Третя за поширеністю злоякісна екстракраніальна пухлина дитячого віку, • походить від примітивних нейронних гребневих клітин, які мігрують від мантийного шару спинного мозку, що розвивається і заселяє симпатичні ганглії і мозковий шар надниркових залоз, • часто у пацієнтів з паранеопластичним синдромом опсоклонус-міоклонус. 	<ul style="list-style-type: none"> • Складається з нейробластів різного диференціювання аж до гангліозних клітин, • невеликі круглі ядра зі скрученим хроматином (сіть з перцем), • 1-4 помітних ядрець, • мізерна еозинофільна цитоплазма, • невиразні межі клітин, • речовина Ніссл у цитоплазмі, • базофільні гранули з ендоплазматичного ретикулума, • нейропіль, • рожевий, фібрилярний позаклітинний матеріал, • іноді лімфоїдний інфільтрат лімфоїдні фолікули. 	<ul style="list-style-type: none"> • S100 (позитивна) • NSE 38-95 % • Neurofilament 63 % • CD56 100 % • Synaptophysin 65-88 % • Chromogranin 60-88 % • приблизно 50 % мають ампліфікацію. MYCN.12, з них 80 % - 90 % показують посилену експресію білка MYCN.1.
<p>Низько диференційована синовіальна саркома [30-32, 50-52] Poorly differentiated synovial sarcoma</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Саркома, двофазна або монофазна з транслокацією t (X; 18; p11; q11) 	<ul style="list-style-type: none"> • Містить як епітеліальні, так і веретеноподібні компоненти до 50-80 %; • кальцифікація; 	<ul style="list-style-type: none"> • Позитивність кератину та віментину • епітеліальний компонент ЕМА (+) в 100 %

Продовження таблиці 1.1

1	2	3	4
	<ul style="list-style-type: none"> • усі пухлини м'яких тканин при цій транслокації вважаються синовіальною саркомою • Synovial sarcoma – історична назва, зв'язок із синовіальною оболонкою спростовано. 	<ul style="list-style-type: none"> • епітеліальний компонент, як правило, великі бліді або стовпчасті клітини; • круглі везикулярні ядра; • темний, рівномірний хроматин; • мізерна цитоплазма з невиразними межами; • судини, подібні до гемангіоперицитоми.. 	<ul style="list-style-type: none"> • t (X; 18; p11; q11) є визначальною.
<p>Пухлина Вільямса або нефробластома [30-32, 53-55]</p> <p>Willm's tumor (WT) or nephroblastoma</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Рак нирок, що зазвичай зустрічається у дітей рідко у дорослих, 1 на 10 000 дітей; • ниркове (55 %), шлунково-кишкове (15 %), тазове (15 %), надниркове (10 %) або гепатобіліарне (5 %) походження; 	<ul style="list-style-type: none"> • Трифазна пухлина, що складається з бластеми, епітеліальних елементів (каналців) та строми; • Бластема повторює конденсовану мезенхіму ембріональної нирки (невеликі, щільно упаковані і мітотично активні клітини); • Епітелій формує різні стадії нормального нефрогенезу, що нагадує збиральні трубочки або нефрони та клубочки; • Строма - міксоїдні і веретеноподібні клітини, • В стромі частим компонентом є клітини скелетної мускулатури, але можуть бути хрящі, жирові тканини, кістки, зрілі гангліозні клітини. 	<ul style="list-style-type: none"> • Cytokeratin (+), • Desmin (+), • WT-1 (+), • NB84 (+), • CCN-3 (+) • Включається в синдром WAGR, синдром Деніса-Драша, синдром Беквіта-Віде.

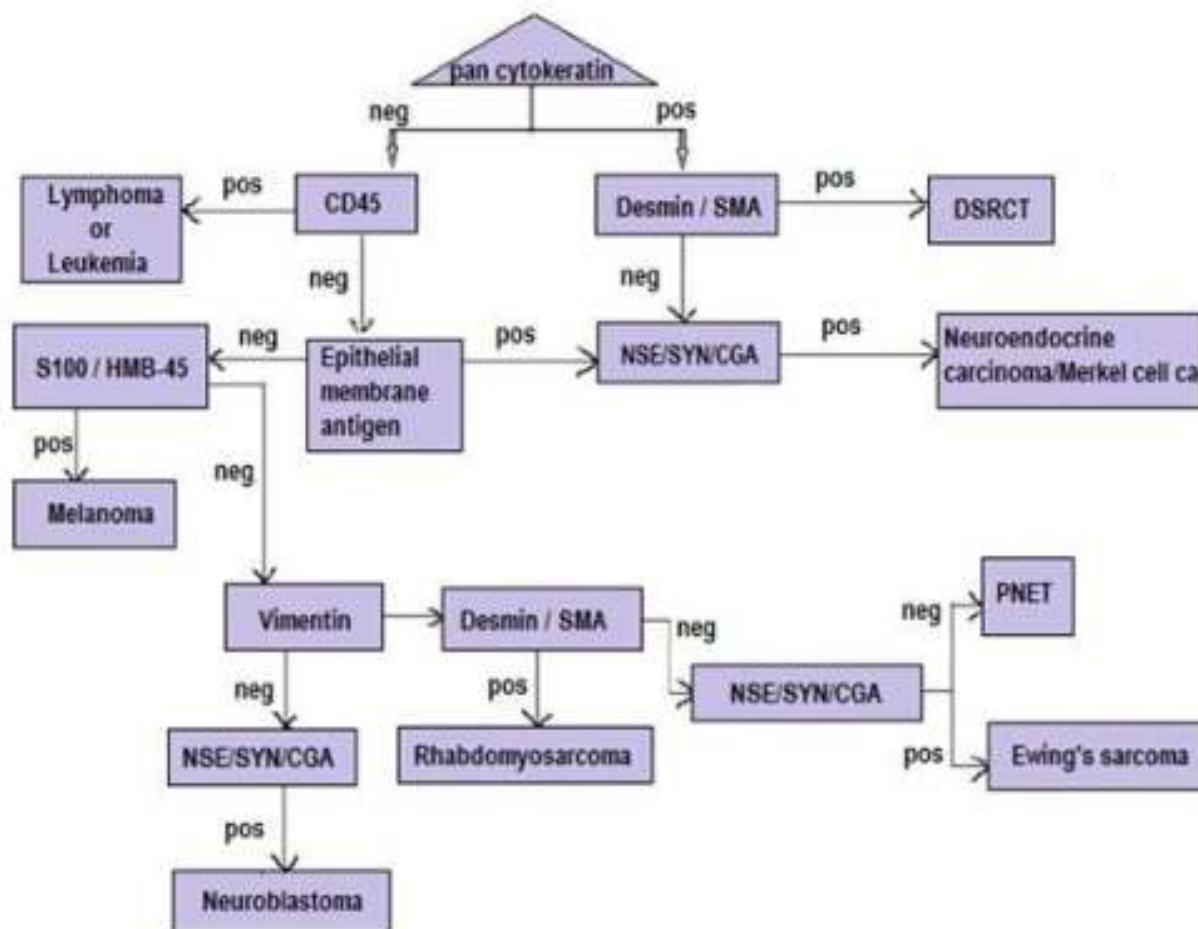
Продовження таблиці 1.1

1	2	3	4
<p>Мезенхімальна хондросаркома [30-32, 56-58]</p> <p>Mesenchymal chondrosarcoma</p>	<p>в будь-якому віці, однаково рідко у Ж та Ч.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Рідкісне, характеризується біморфним малюнком, що складається з низько диференційованих дрібних круглих клітин і островів добре диференційованого гіалінового хряща 	<ul style="list-style-type: none"> • Поєднання хрящових островів і високої клітинної проліферації з численними судинними розривами; • Різкий перехід від гніздоподібних структур до саркоми та хрящової тканини з кальцифікацією; • Висока проліферація дрібних клітин з міоперицитоматозним малюнком. 	<ul style="list-style-type: none"> • MC2/CD99 (+) • Десмін • S100 (+) виділяє хондроїдний компонент. SOX9(+) • синтез HEY1-NCOA2, злиття екзону HEY1 до екзону NCOA2 NX 13, що на хромосомі 8: 8q21.1 та 8q 13.3; • делеція (8) (q 13.3q21.1).
<p>Дрібноклітинна остеосаркома [30-32, 59-61]</p> <p>Small cell osteosarcoma</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Найбільш поширена злоякісна кісткова пухлина, 30-80 % від первинних сарком кісток; • пік 10-30 років; • довгі циліндричні кістки, колінний суглоб (50 %) та плечова кістка. 	<ul style="list-style-type: none"> • Дрібні клітини з мізерною цитоплазмою; • мітози 3-5 при $\times 400$; • виробництво остеїдів, подібних до мережива, • глікоген присутній у 30 % випадків. 	<ul style="list-style-type: none"> • Не існує специфічного імунофенотипу • CD99 (+) • Остеокальцин (+) • злиття гену EWSR 1-FU 1 • перебудови хромосом 6, 16 та 17.

Примітка. Ч – чоловіки, Ж – жінки, МІ – мітотичний індекс.

Кращим підходом до діагностики та лікування цих пухлин є практичний мультидисциплінарний підхід, який включає інтеграцію клінічних, рентгенологічних та гістопатологічних результатів з обов'язковим FISH. З іншого боку, треба відзначити, що більшість м'якотканинних ДКСП лікується за одним протоколом хіміотерапії, розробленого для сарком сімейства Юінг (EFT) 2001 року не залежно від первинної локалізації. За інформацією літературних

джерел, більшість м'якотканинних ДКСП виникають у пацієнтів дитячого та молодого віку, так само як і саркоми Юінга [30-35].



Примітка. SMA - smooth muscle actin (актин гладких м'язів); SYN — synaptophysin (сінаптофізин); CGA - chromogranin A (хромогранін А); NSE - neurone specific enolase (нейрон специфічна енолаза); HMB45 - anti-melanoma antibody (визначаючий меланому антиген); CD45 - leukocyte common antigen (загальний лейкоцитарний антиген); DSRCT - desmoplastic small round cell tumour (десмопластична дрібно-клітинна пухлина); PNET - primitive neuroectodermal tumour (примітивна нейроектодермальна пухлина); pos. – positive (позитивний); neg. – negative (негативний).

Рисунок 1.1 – Імуногістохімічна діагностика дрібно-кругло-синьо-клітинних за L. D'Cruze et al. (2013) [60].

Рисунок 1.1 добре відображає імуногістохімічний алгоритм відокремлення м'якотканинних ДКСП від подібних низькодиференційованих пухлин іншого походження, в першу чергу, дрібноклітинних карцином й ККМ, що

мають позитивність на цитокератини, НМВ45 позитивних меланом та лімфо-проліферативних станів, які дають позитивну реакцію з загальним лейкоцитарним антигеном CD45.

Характеристика найбільш корисних ІГХ маркерів в діагностиці ДКСП представлена в таблиці 1.2.

Таблиця 1.2 – Характеристики імуногістохімічних маркерів, що використовують для діагностики м'якотканинних дрібно-кругло-синьо-клітинних пухлин

Маркер	Клітинна функція протеїну	Позитивний контроль в нормальних тканинах	Специфічність в пухлинах
1	2	3	4
CD99 [30,62-63].	Трансмембранний глікопротеїн 30-32 КДа, відіграє роль у клітинній адгезії та регуляції проліферації клітин	1. Коркові тимоцити 2. Клітини Сертолі 3. Ендотелій 4. Острівці підшлункової залози 5. Епендима 6. Епітелій (уротелій, плоский епітелій, стовпчастий епітелій)	1. Саркома Юінга - 90 %, 2. Лімфобластна лімфома - 90 %, 3. Синовіальна саркома - > 75 %, 4. Мезенхімальна хондросаркома - 50 %.
S100 [64-67].	Беруть участь в регуляції фосфорилювання, роботи транскрипційних факторів, запаленні, гомеостазу кальцію та динаміки компонентів цитоскелету, активності ензимів, клітинного росту та диференціації.	Складається з двох субодиниць α і β : α-α ізотип в міокарді, скелетній мускулатурі та нейронах; α-β ізотип в хондроцитах, глії та шкірі; β-β ізотип , знайдений у клітинах Лангерганса та швановських клітинах.	1. Меланома – 97-100 %, 2. Нейробластома - 90 %, 3. Міксоїдна ліпосаркома - 50 %, 4. Мезенхімальна хондросаркома – в хондроїдному компоненті 5. Гастроінтестинальна стромальна пухлина 75 % 6. Шванома – 90-100 %.

Продовження таблиці 1.2

1	2	3	4
Десмін [67-69].	Це проміжний філамент гладкої і скелетної мускулатури, у скелетних м'язах десмін локалізується на Z-зоні, міофібробласти частково втрачають	Міобласти, міометрій, клітини гладкої мускулатури, децидуальна реакція, ендометрій (вогнищевий), строма маткових труб, зірчасті клітини печінки, мезотелій	1. PNET 2. Десмопластична круглоклітинна пухлина (забарвлення точкове перинуклеарне), 3. Нейробластома, 4. Мезотеліальні клітини та пухлини, 5. Пухлина Вілямса, 6. Медулобластома
NB 84 [70-72].	Антитіло, вирощене проти антигену нейробластоми з тканини нейробластоми людини. Він розпізнає молекулу 57 кД.	NB84, більш чутливий, але менш специфічний, ніж синаптофізин для нейробластичної диференціації.	1. Нейробластома (75 %) 2. Саркома Юінга (16 % –25 %) 3. PNET (рідко) 6. Десмопластична круглоклітинна пухлина.
WT-1 [73-75].	Пухлинний білок Вілмса у людини кодується геном WT-1 на хромосомі 11p13. Продукт гена WT-1 демонструє схожість з цинковими залишками факторів росту ссавців (EGR1) та (EGR2).	Сечостатева система, мезотеліальні клітини, ендотелій	1. Пухлина Вільямса 2. Гострий мієлоїдний лейкоз 3. Десмопластична дрібноклітинна пухлина 4. Мезотеліома 5. Серозна АК яєчника, маткових труб, перитонеальних пухлин
NSE [76-78].	Білок, який кодується геном ENO2, на короткому плечі 12-ї хромосоми. Задіяний у такому біологічному процесі як гліколіз.	Ідентифікація нейрональних клітин та клітин з нейроендокринною диференціацією. NSE виробляється НЕК.	1. Нейробластома 100 % 2. PNET 50-90 % 3. Саркома Юінга, 4. Карцинома з клітин Меркеля, 5. НЕК.

Продовження таблиці 1.2

1	2	3	4
SMA [79-81].	Є однією з 6 різних ізоформ актину, бере участь у скоротливому апараті гладкої мускулатури.	Гладкі м'язи судин, шлунково-кишкового тракту, сечостатевої системи	1. Рабдоміосаркома 90 % 2. Десмопластична круглоклітина пухлина 50 %-90 % 3. Лейомісаркома 4. ГІСТ
SYN [82-84].	Основний синаптичний глікопротеїн везикул р38 з чотирма трансмембранними доменами вагою 38 кДа. кодується геном SYP.	Присутній в нейроендокринних клітинах, нейронах ЦНС, які беруть участь у синаптичній передачі. А також наднирники та острівці підшлункової залози.	1. Саркома Юінга 90 % 2. Нейробластома 50 % 3. Дрібноклітинний рак 90 % 4. Ретинобластома, 5. Феохромоцитомата, 6. Карциноїд, 7. Медуллобластиома 8. Медулярна карцинома ЩЗ
CGA Chromogranin A [78, 85-87].	Член сімейства нейроендокринних секреторних білків нейронів та ендокринних клітин.	Є попередником пептидів, таких як вазостатин, панкреастатин, катестатин, парастатин, серпенін та інші	7. Медуллобластиома 8. Медулярна карцинома ЩЗ

Примітка. PNET – примітивна нейроектодермальна пухлина, ГІСП – гастроінтестинальна стромальна пухлина, ЩЗ – щитоподібна залоза, АК – аденокарцинома, НЕК - нейроендокринна карцинома.

1.3 «Великоклітинні» недиференційовані пухлини, проблеми діагностики пухлин з клініко-морфологічного синдрому «Рак невідомої первинної локалізації»

Більшу частину анонімних метастазів великоклітинних недиференційованих пухлин беруть на себе карциноми, походження яких стає метою діагностичного пошуку. Клініко-морфологічний синдром «Рак невідомої первинної локалізації» (РНПЛ) визначається багатьма авторами як метастатична карцинома без встановленого джерела походження. В National Institute for Health and Care Excellence, Australia (Національний інститут з догляду за здо-

ров'ям, Австралія) базуючись на принципах необхідних діагностичних заходів для отримання діагнозу сформував три категорії верифікації клінок-морфологічного синдрому «Рак невідомої первинної локалізації» [10].

У підгрупі 1 «злоякісні пухлини невідомого походження» онкохворим визначались діагнози після проведення повного клінічного обстеження. У підгрупі 2 з назвою «попередній рак невідомої первинної локалізації», отриманий матеріал з пухлин проходив обов'язкове морфологічне дослідження, тобто метастатична карцинома була верифікована цитологічно або гістологічно, але через анапластичну будову походження карциноми залишилось невизначеним. У підгрупі 3 «підтверджений рак невідомої первинної локалізації» – метастатична карцинома була встановлена гістологічно, і всі додаткові більш специфічні дослідження (наприклад ІГХ) не допомогли визначити джерело походження [10]. Частота таких підтипів РНПЛ в Україні невідома (немає таких статистичних показників), але за даними різних зарубіжних авторів, 3 категорія «підтверджений РНПЛ» є рідкістю [89-91]. Але суб'єктивні фактори впливають на діагностичний пошук, заважаючи виконанню повного алгоритму необхідних заходів, а саме:

- повний збір анамнезу і фізикальне обстеження;
- загальний аналіз крові, біохімічний аналіз крові, ЛДГ, аналіз сечі;
- КТ грудної клітини, черевної порожнини, тазу;
- PSA сироватки у чоловіків;
- мамографія у жінок;
- біопсія з клінічною оцінкою, що заснована на анамнезі, фізичному обстеженні, лабораторних аналізах;
- скринінг імуногістохімічних маркерів на карциноми легень та колоректальний рак (СК7, СК20, TTF-1, CDX-2) [20].

Ситуації, в яких первинний осередок карциноми важко або неможливо виявити, в фаховій літературі пов'язують з декількома теоріями: (1) первинна неоплазія існувала і спонтанно редукувалась, проте її метастатичні клітини все ще активні, створюючи дисемінацію і викликаючи симптоми; (2) первин-

на пухлина продукує метастатичні клітини постійно і в такому масивному об'ємі, що локальний ріст відсутній або незначний; (3) карцинома залишається надто малою для ідентифікації, але метастатичні вогнища зростають, формуючи клінічну картину онкозахворювання; (4) не існує первинного джерела, а метастази обумовлені нормальними клітинами в аномальних місцях, що зазнають злякисного перетворення і т. ін. [90].

Прояви та симптоми дисемінованих форм раку залежать від розташування метастатичних вогнищ і здебільшого мають такі ознаки: збільшення різних груп лімфатичних вузлів (можливо нетипові для виявленої будови та імунофенотипу), утруднення дихання, збільшення розміру живота за рахунок абдомінальної пухлинної маси та асцити, нудота, біль у кістках, головний біль, епілептичні судоми, зміни поведінки тощо. Найчастіші симптоми в цій групі пацієнтів це – анорексія, схуднення та хронічна втома. Медіана виживання становить приблизно 6-9 місяців, що звичайно є віддзеркаленням перебігу саме агресивних пухлин [10, 89-92]. З 2003 за наслідками лікування РНПЛ прийнято ділити на дві підгрупи: із відносно сприятливим прогнозом (20 %) і несприятливим (80 %) [10], що представлені у таблиці 1.3.

Таблиця 1.3 – Сприятливі та несприятливі фенотипи клініко-морфологічного синдрому «Рак невідомої первинної локалізації» [10]

Favourable subset/ Сприятливі	Unfavourable subset/ Несприятливі
1	2
Poorly differentiated carcinoma with midline distribution (extragonadal germ cell syndrome) / Низькодиференційована карцинома з розподілом за середньою лінією (екстрагональний зародково-клітинний синдром)	Adenocarcinoma metastatic to the liver or other organs / Аденокарцинома метастазує в печінку або інші органи
Females with papillary adenocarcinoma of peritoneal cavity / Жінки з папілярною аденокарциномою черевної порожнини	Multiple cerebral metastases / Множинні мозкові метастази
Females with adenocarcinoma involving only axillary lymph nodes / Жінки з аденокарциномою, що уражує лише аксилярні лімфатичні вузли	Multiple lung or pleural metastases / Множинні метастази у легенях або плеврі

Продовження таблиці 1.3

1	2
Males with blastic bone metastases and elevated PSA (adenocarcinoma) / Чоловіки з бластними метастазами в кістки і підвищеним рівнем сироваткового PSA (аденокарцинома)	Multiple metastatic lytic bone disease (non-prostate-specific antigen PSA) / Множинні літичні метастази в кістки (без підвищення PSA)
Squamous cell carcinoma involving cervical lymph nodes / ПР, що уражує шийні лімфатичні вузли	Squamous cell carcinoma of the adomino/pelvic cavity / ПР черевної / тазової порожнини
Isolated inguinal adenopathy (squamous carcinoma) / Ізольована пахова аденопатія (ПР)	
Poorly differentiated neuroendocrine carcinoma / Нейроендокринна карцинома (G3)	
Adenocarcinoma with a colon-cancer profile (СК 20+, СК 7-, CDX-2+) / Аденокарцинома з імунофенотипом раку товстої кишки	
Merkel cell adenopathy of unknown origin / Аденопатія з клітин Меркеля невідомого походження	
Single potentially resectable tumour / Одиначна потенційно резектабельна пухлина	

Примітка. PSA, prostate-specific antigen (простат-специфічний антиген), СК – цитокератин, АК — аденокарцинома, ПР – плоскоклітинний рак.

Група із сприятливими наслідками, включає фенотипи пухлин, що відповідають на місцеве та/або системне лікування і серед цих пацієнтів констатують вищий відсоток виживання. Саме за ці 20 % треба боротися і намагатисявилучити їх на ранньому етапі для підбору адекватного типу лікування. Але більшість пацієнтів з РНПЛ (80 % - 85 %), на жаль, не належать до цього списку. Чутливість до терапії їх невелика і медіана загального виживання, як правило, <1 року (6-10 місяців) [96] (табл. 1.4).

Структуру всіх випадків РНПЛ можна представити як: АК помірного (60 %) та АК низького ступеня диференціювання або недиференційовані карциноми (30 %), ПР (приблизно 5 %) і взагалі недиференційовані пухлини (5 %) [89-92]. Сучасні рекомендації пропонують застосовувати ІГХ з метою визначення тканини походження і знаходження хіміо- та гормон-чутливих, ін-

шими словами, потенційно курабельних пухлин (таких як лімфоми, ембріональні пухлини або гормонозалежні карциноми, наприклад, молочної залози, простати і т. ін.) [94-96].

Таблиця 1.4 – Характеристика терапевтичних заходів та прогноз сприятливих фенотипів клініко-морфологічного синдрому «Рак невідомої первинної локалізації» [97]

Гістологічна форма	Клінічний підтип	Підходи в терапії	Прогноз
1	2	3	4
АК	Жінки, перитонеальний папілярний карциноматоз	Лікування як III стадія раку яєчників	Виживаність зростає
	Жінки із ураженням піхвових лімфатичних вузлів	Лікування як при первинній карциномі молочної залози	Виживаність зростає
	Чоловіки із метастазами в кістки й високим рівнем сироваткового PSA / або у метастатичній пухлині ІГХ PSA-позитивний статус	Лікування як при метастатичному раці простати	Виживаність зростає
	Одиничний метастаз	Хірургічне видалення та/або променева терапія ± хіміотерапія	Виживаність зростає
	Товстокишковий профіль раку (ІГХ та/або молекулярний аналіз)	Лікування як при метастатичному КРР	Виживаність зростає
ПР	Ураження шийних лімфатичних вузлів	Лікування як при первинному локальному раці голови та шиї із ураженням ЛВШ	5-річна виживаність 25 % - 30 %
	Ураження пахових лімфатичних вузлів	Видалення пахових лімфатичних вузлів променева терапія ± хіміотерапія	5-річна виживаність 15 % - 20 %
Низько диференційована карцинома	Екстрогонадний ембріональний синдром	Лікування як при поганому прогнозі ембріонального раку	10 % - 20 % виликіваних

Продовження таблиці 1.4

1	2	3	4
НЕК	Агресивний (дрібно- або великоклітинний рак, низькодиференційований рак)	Лікування як при екстенсивній стадії дрібноклітинного раку легенів	Високий показник відповіді
	Низького ступеня злоякісності	Лікування як при атипovому карциноїді	Індолентий перебіг

Примітка. АК – аденокарцинома, ПР – плоскоклітинний рак, PSA - простат-специфічний антиген, ЛВШ – лімфатичні вузли шиї, КРР – колоректальний рак, НЕК – нейроендокринна карцинома.

Таким чином, патологоанатомічний висновок після проведення рутинного забарвлення гематоксиліном і еозином повинен відповісти на запитання про гістологічну форму будови фенотипу клініко-морфологічного синдрому «РНПЛ», а ІГХ метод, по-можливості, підтвердити або спростувати клінічний підхід до лікування (табл. 1.4).

1.4 Характеристика метастатичних карцином сприятливих фенотипів клініко-морфологічного синдрому «Рак невідомої первинної локалізації»

Метастатичний процес представляє собою поширення, виживання і розмноження злоякісних клітин, що походять з первинної пухлини, в далеких від неї анатомічних місцях. Сучасні дослідження констатують, що майже кожен з трьох хворих на рак має віддалені метастази на час встановлення клінічного діагнозу. У більшості випадків первинна пухлина та метастази ідентифікуються одночасно, але для деяких пацієнтів первинне ураження не може бути виявлено на етапі первинної клінічної оцінки, в таких випадках проводиться діагностика РНПЛ. Клінічна ситуація з РНПЛ досить важко управляється через відсутність стандартів лікування в контексті початкового терапевтичного підходу. Зустрічаємість сприятливих фенотипів клініко-

морфологічного синдрому «РНПЛ» коливається в діапазоні 10-20 % [97]. Наведемо коротку характеристику кожного з них.

1.4.1 Низькодиференційована карцинома з розподілом по середній лінії тіла (екстрагонадний зародково-клітинний синдром)

Дослідження екстрагонадних тератом розширює уявлення про пухлини з герміногенних клітин, які зустрічаються в гонадах дорослих, так звані семіноми яєчок у чоловіків та дисгерміноми яєчників у жінок. Більш рідкісні «не-семіноми», що описані також поза межами гонад, а саме, по середній лінії мозку (епіфіз і ділянка над турецьким сідлом) й в передньому середостінні (тимус) потребують ретельної диференційної діагностики з метастазами карцином іншого походження. До речі, такий розподіл по середній лінії тіла в сучасних дослідженнях пояснюється міграцією примітивних клітин зародків під час розвитку [98-101]. Отже, під час верифікації допомагають ознаки морфологічної подібності, однаковість цитогенетичної аномалії з ізохромосомою 12p, описаної вперше Atkin & Baker (1982), та ІГХ профіль тестикулярних семіном / «не-семіном», їх аналогів в яєчнику, передньому середостінні й по середній лінії мозку [98].

Більш ніж 90 % екстрагонадних пухлин з герміногенних клітин (ЕПГК) зустрічаються у дорослих людей у віці від 20 до 35 років. Найбільш поширеним місцем первинних ЕПГК є середостіння, яке складає 50 ~ 70 % всіх первинних ЕПГК. Клінічна симптоматика відповідає локалізації і є загальною. Отже, медіастінальне розташування визначається болем у грудях, кашлем, задишкою та лихоманкою. Тоді як найпоширенішими клінічними проявами для герміногенних пухлин центральної нервової системи є головні болі, порушення ендокринної системи, порушення зору та ознаки підвищеного внутрішньочерепного тиску.

Цікавим є той факт, що хворіють на пухлини з герміногенних клітин в центральній нервовій системі переважно діти та підлітки: приблизно 90 %

випадків до 20 років, із піком від 10 до 20 років [102]. Локалізація новоутворення у позаочеревинному просторі може супроводжуватись больовим синдромом та втратою ваги [99].

Відповідно до клінічної картини, морфології та цитогенетики, пухлини з герміногенних клітин і тератоми людини можна класифікувати на п'ять типів: (1) тератоми / пухлини жовткового мішка дитинства (переважно у жінок); (2) семіноми та «не-семіноми» молодих дорослих (переважно у чоловіків); (3) сперматоцитарні семіноми людей похилого віку, виключно в яєчках; (4) дермоїдні кісти, майже виключно в яєчнику; (5) гестаційні трофобластні пухлини [100-101].

З перелічених груп 1 та 2 знаходять як в гонадах, так і в екстрагонадних локалізаціях по середній лінії тіла, що в таких випадках потребує особливої уваги через необхідність проведення диференційної діагностики з метастазами карцином іншого походження. Також, ми можемо зазначити деяку різницю між цими двома типами.

Пухлини 1 типу частіше зустрічаються на позагонадних ділянках, ніж у гонадах, тоді як пухлини 2 типу — здебільшого в гонадах та, значно рідше, в двох головних екстрагонадних регіонах: передньому середостінні (тимус) і по середній лінії головного мозку (епіфіз, ділянка над турецьким сідлом). З іншого боку, пухлини 1 типу окрім цих ділянок можуть виникати в області шиї, задньому середостінні, заочеревинному просторі, крижово-копчиковій області, а також інших менш розповсюджених локалізаціях по середній лінії тіла [98,102].

В порівнянні з пухлинами з герміногенних клітин гонадних ділянок, точне діагностування ЕПГК виключно на скельцях із рутинним забарвленням гематоксилін-еозином (ГХЕ) можливо патоморфологами високої кваліфікації з досвідом роботи в педіатрії, через молодий вік пацієнтів, неспецифічні клінічні ознаки та мінливі морфологічні характеристики. Серед онкоморфологів широко визнано, що ІГХ дослідження відіграє важливу роль у верифікації цих пухлин [103], проте все одно не відповідає на всі питання.

1.4.2 Жінки з ізольованим папілярним канцероматозом очеревини

Жінки з ізольованим папілярним канцероматозом (ІПК) очеревини відносяться до сприятливого фенотипу клініко-морфологічного синдрому «РНПЛ» через вдосконалення алгоритмів сучасного лікування дисемінованих форм раку яєчників [97]. Дослідження шляхів внутрішньочеревного поширення метастазів карцином та умовах захисного перитонеального бар'єру проти загального пухлинного розповсюдження спонукали дослідників останніх трьох десятиріч розглядати перитонеальний канцероматоз як локально-регіональну хворобу. Перспективними для покращення результатів лікування і збільшення виживаності пацієнок є комбінація системної хіміотерапії, агресивної циторедуктивної хірургії та інтраперитонеальної гіпертермічної хіміотерапії, але за умови відсутності метастазів в інших органах і системах [104-105].

Як було зазначено, пацієнтки з ІПК очеревини без первинного джерела звичайно отримують лікування як жінки з дисемінованою стадією раку яєчників (III/IV). Припущення клінічної, морфологічної та молекулярної подібності дозволяє такий підхід, але стримує вивчення унікальної біології ІПК очеревини як фенотипу клініко-морфологічного синдрому «РНПЛ». По-перше аденокарцинома з яєчника (АКЯ) часто викликає питання через подібність метастазів первинних шлунково-кишкових, панкреато-біліарних і ендометріальних карцином, які демонструють макроскопічні, мікроскопічні й ІГХ ознаки АКЯ. Як приклад, первинні муцинозні АКЯ не мають високоспецифічних ІГХ маркерів, і тому це – діагноз виключення. Характерний для муцинозних АКЯ фенотип [СК 7 (+) / СА-125 (+/-) / СК 20 (-/+) / CDX-2 (-/+)] часто мають первинні карциноми шлунково-кишкового тракту (ШКТ) та панкреато-біліарного сегменту. Якщо значна кількість серозних та ендометріодних АКЯ демонструють позитивну експресію маркерів PAX-8 та ER, то в первинних муцинозних АКЯ вони, більшою мірою, відсутні, що робить діагностику їх метастазів без встановленого джерела дуже складною [23,92].

Повертаючись до перитонеального канцероматозу, в літературі описують три шляхи його поширення: (1) *випадковий проксимальний розподіл*, під час якого клітинна імплантація в очеревину обумовлена формуванням поверхневих молекул адгезії малігнізованих клітин (як приклад, високодиференційована АК і НЕП червоподібного відростку, колоректальний рак, карциноми шлунка та серозні АКЯ); (2) *повний перерозподіл*, де спостерігається слабе прикріплення клітин пухлини в черевній порожнині внаслідок незначної агресивності пухлини (як приклад, дифузна злоякісна мезотеліома очеревини або псевдоміксома); і (3) *масивний дифузний канцероматоз*, при якому поверхні молекули адгезії пухлинних клітин заблоковані через утворення позаклітинного слизу, такі клітини наче ковзають по поверхні та поширюються на широкі ділянки. Така агресивна біологічна поведінка притаманна високозлоякісним низькодиференційованим пухлинам (як приклад, АК з G3 червоподібного відростку, колоректальний рак із слиноутворенням або муцинозна АКЯ) [104].

Значна кількість метастазів серозних АК у жінок пов'язана з яєчниками, була теорія, що первинно вони і виникають з яєчників далі прогресуючи у черевну порожнину [104]. Але останні дослідження серозних АК розрізнили дві окремі нозологічні одиниці: високодиференційовану «low-grade» та низькодиференційовану «high-grade» карциноми. Таким чином, було розроблено нову модель виникнення серозних епітеліальних пухлин яєчників із визначенням окремо серозних карцином I-го типу та II-го типу [104-106]. Тип I є високодиференційована «low-grade» та показує значну частоту мутацій генів BRAF і / або KRAS, але немає змін онкогену-супресору TP53. В свою чергу, тип II – низькодиференційована «high-grade» характеризується характерною геномною нестабільністю із залученням мутації TP53 [106-108]. Саме тому згідно до статистичних даних, це агресивне захворювання часто діагностують із значним ступенем розповсюдженості.

Найбільш імовірно, пояснити такі генетичні розбіжності можна шляхом різних шляхів канцерогенезу цих типів серозних АКЯ [108-110]. Так, за

даними літератури АКЯ «low-grade» може трансформуватись в «high-grade», проте загалом вони розвиваються іншим шляхом [116-117]. А саме АКЯ «low-grade» виникає із пограничної серозної пухлини / атипової проліферуючої серозної пухлини (serous borderline tumor / atypical proliferative serous tumor – 8442/1), що за Міжнародною класифікацією онкологічних хвороб репродуктивної системи жінок (International Classification of Diseases for Oncology ICD-O 2013) відноситься до неспецифічних, пограничних пухлин та пухлин з непередбачуваною клінічною поведінкою [111-112]. Неінвазивна серозна пухлина демонструє достатню кількість мікропапілярних патернів і частіше асоційована з синхронним та / або метасинхронним інвазивним процесом. Це пояснюється феноменом подібності мутацій генів BRAF і / або KRAS з невеличкими геномними порушеннями в пограничній серозній пухлині / атиповій проліферуючій серозній пухлині та «low-grade» серозній АКЯ [113-116].

Базуючись на традиційній моделі канцерогенезу раку яєчника, поверхневий мезотелій яєчника є найбільш вірогідним джерелом серозних неоплазій, здебільшого як наслідок трубних метапластичних змін епітелію (Мюллеров тип метаплазії), що виникає внаслідок мутацій через події *овуляторної травми*. Але досить вірогідним виявляється альтернативне джерело виникнення серозної карциноми з тубулярного епітелію, що базується на значному зниженні ризику при сальпінго-оофоректомії матеріалів у жінок з BRCA мутації. До того ж, первинна карцинома фаллопієвої труби є дуже рідкою, порівняно з карциномами яєчників [117-119]. На підставі повного видалення яєчників та фаллопієвих труб у жінок з високим ризиком розвитку АКЯ, профілактично видалені сальпінго-офоректомічні фрагменти тканин виявили маленькі неінвазивні та інвазивні карциноми частіше в фаллопієвих трубах, ніж яєчниках [106-107, 120].

Епітеліальні пухлини видалених фаллопієвих труб гістологічно були серозними тубулярними ітраепітеліальними карциномами (in situ) або «high-grade» серозними інвазивними карциномами. І головне, вони мали ідентичні

до «high-grade» серозної карциноми яєчників мутацію TP53, аберантну експресію протеїну p53 високу проліферативну активність та значну геномну нестабільність [106, 109, 111].

Подібні дослідження також показали, що серозні тубулярні інтраепітеліальні карциноми (in situ) були знайдені в 60 % жінок з «high-grade» серозними інвазивними карциномами яєчників або очеревини. Фаллопієві труби були облітеровані пухлиною до 20 % випадків. Знайдення подібності мутації TP53 для Ca in situ та дисемінованих варіантів, розглядається як клонування процесу, до того ж порівняння довжини теломер Ca in situ та клітин асоційованих з яєчниками пухлин, наочно демонструє, що перше є попередником другого [119, 121].

Можливість полів зміненого первинного або метапластичного епітелію трубного типу, можуть також бути результатом мультифокальних ушкоджень, тому що в 15-30 % випадків «high-grade» серозних інвазивних карцином яєчників або очеревини, труби виявляються нормальними без інтраепітеліальних або інвазивних карцином, незважаючи на прискіпливе гістологічне дослідження [109, 111-112].

В таких випадках яєчниковий поверхневий епітелій або епітелій кортикальних інклюзивних кіст може бути вірогідним джерелом раку. Кортикальні інклюзивні кісти мають бути вислані плоскими подібними до поверхневого мезотеліума яєчників клітинами, але більшість з них мають клітини гістологічно та імуногістохімічно подібні до трубного епітелію, що можливо імплантувався туди з труби під час овуляції. Хоча, «high-grade» екстра-маткові серозні карциноми можуть виникати з фаллопієвих труб, яєчників або рідко з очеревини, часто джерело не може бути встановлено через дисемінацію хвороби, в чому і полягає актуальність дослідження цієї діагностичної проблеми. Загальна характеристика серозних карцином цих локалізацій показує однакову епідеміологію та клінічну поведінку [121].

Згідно канцерогенезу «high-grade» серозної АКЯ з метастазами в черевній порожнині, вона повинна розглядатись як «тазова низькодиференційо-

вана серозна карцинома». Такі локалізації виявлення «high-grade» серозної АК як маткові труби, яєчники та очеревина об'єднуються внаслідок генетичної подібності та припущення їх походження з інтраепітеліальної неоплазії маткової труби [117].

1.4.3 Жінки з метастазами карциноми в ізольовані аксилярні лімфатичні вузли

Метастатична АК виявлена в ізольованих однобічних аксилярних лімфатичних вузлах без вірогідних джерел в органах, є складною проблемою для лікаря та пацієнта. Стандартизований діагностичний підхід до пошуку первинного осередку та визначення стадії онкозахворювання включає двобічну мамографію, КТ грудної клітини / черевної порожнини / тазу, доповнену додатковими рентгенологічними та ендоскопічними дослідженнями [122-123]. У разі гістологічної верифікації метастазів АК або недиференційованної карциноми в пахвових лімфатичних вузлах у жінок дуже ймовірно, що пухлина походить від молочної залози. РНПЛ становить 0,3-0,5 % усіх злоякісних новоутворень молочної залози, і це часто стосується жінок із середнім віком 52,4 року [124-125].

Першим кроком у лікуванні вірогідного раку молочної залози є гістологічний діагноз метастатичного ураження, яке у випадку РНПЛ представлене виключно пахвовими лімфатичними вузлами. Патолог повинен бути в тісному контакті з клініцистом; немає жодного сумніву, що близька співпраця оптимізує можливості діагностики. Другий крок - виконання зображень грудей першого рівня, таких як мамографія та сонографія з використанням усіх застосувань, що дозволяють підвищити точність діагностики. Третій крок - виконання МРТ грудей, за допомогою якого можна визначити у багатьох випадках малі ракові захворювання, як рекомендовано вказівками European Society of Breast Cancer Specialists – EUSOMA (дозволяє ідентифікувати первинну пухлину приблизно в 70-80 % випадків негативних досліджень першо-

го рівня) [126-128]. Важлива інформація за місцем і ступенем лімфаденопатії (локалізованої або генералізованої) повинна збиратись шляхом ретельного оцінювання всіх регіональних лімфатичних вузлів. Відмінність в тому, що локалізована або регіонарна лімфаденопатія включає лише одну анатомічну ділянку і являє собою патологію в межах, де лімфатичні вузли отримують дренаж, а генералізована лімфаденопатія має три або більше неспоріднених ділянок лімфатичних вузлів і може бути спричинена системними інфекціями, такими як ВІЛ або автоімунні розлади [127-129].

В літературі описують також такі ознаки, як розміри лімфатичних вузлів (діаметром менше 1 см майже завжди є доброякісними та вторинними до неспецифічних реактивних причин), локальний біль (в більшості випадків, свідчить про недавній запальний процес) й текстура лімфатичних вузлів (м'які, тверді або еластичні). Еластичний і м'який лімфатичний вузол свідчить про лімфому, а твердий - це скоріше метастатичний рак. Співіснування аденопатії зі спленомегалією може бути диференційним фактором між локалізованим захворюванням та системною хворобою. Лімфаденопатії, які мають спленомегалію, свідчать про такий системний стан, як інфекційний мононуклеоз, лімфому, гострий або хронічний лейкоз, токсоплазмоз, хворобу котячих подряпин тощо [124-129].

Жінки з АК МЗ, що метастазують в аксиллярні лімфатичні вузли, складають достатньо малий відсоток сприятливих фенотипів РНПЛ. Але виникає питання про наявність біологічних відмінностей між варіантами місцево-розповсюдженого вузлово-позитивного раку МЗ та описаного вище фенотипу клініко-морфологічного синдрому «РНПЛ».

1.4.4 Ізольовані метастази плоскоклітинної карциноми в лімфатичні вузли шиї

За даними ВООЗ класифікації пухлин голови та шиї, РНПЛ з ізольованим ураженням лімфатичних вузлів шиї (ЛВШ) на 75-80 % представлені ПР і

на 2-20 % недиференційованим раком [130]. Тактика лікування гістологічного фенотипу ПР з РНПЛ проводиться як при первинному локальному ПР голови та шиї із ураженням регіонарних ЛВШ ($T_{1-3}N_{1-3}M_0$), але менш ніж в 25 – 30 % цей підхід призводить до 5-річної виживаності пацієнтів [97, 131]. В наслідок того, що тільки 50 % спостережень мають одиничний метастатичний ЛВШ, більшість демонструють стадію N2a, b або c із співвідношенням чоловіки: жінки як 4:1.

Окремо визначаються такі види метастатичних карцином, як недиференційований рак назофарінгеальної ділянки, спричинена вірусом Епштейн Барр та ВПЛ-залежний ПР орофарінгеальної ділянки. Метастази ПР орофарінгеальної ділянки часто є позитивним на p16 і мають перевагу у незроговілих формах. Прогноз метастазів в ЛВШ залежить від стадії, але відмічають що він кращий при ВПЛ-залежних ПР, порівняно з іншими гістологічними формами [130, 132-133].

Ділянки носової порожнини і навколоносових синусів займають відносно малий анатомічний простір, але вони також є місцем походження ПР. Шістдесят відсотків синоназальних пухлин виникають в верхньощелепної пазусі (ВЦП), а якщо враховувати лише навколоносові пазухи, то 77 % злоякісних пухлин виникають у ВЦП, 22 % в решітчастій та 1 % в клиноподібній і лобовій пазухах [134-135]. ПР навколоносових пазух становить біля 1 % від всіх злоякісних пухлини і близько 3 % від всіх ПР голови та шиї. Особливістю злоякісних неоплазій цих ділянок є пізні звертання пацієнтів (T3-T4) в наслідок відсутності больового синдрому та незначних клінічних проявів, що викликає начебто анонімне метастазування в ЛВШ [136-138].

Найбільш метастатично небезпечними ділянками голови та шиї в літературі описують зони ротоглотки, носоглотки та синоназальних пазух. Але звичайно метастаз ПР в ЛВШ може брати початок з будь якого місця голови і шиї (вірогідно гортань або стравохід). Такий фенотип РНПЛ здебільшого діагностують між п'ятою та сьомою декадою життя пацієнтів (більшість чоловіки) з швидкою прогресією та ускладненнями від дисемінації процесу [133].

Вірогідна наявність іншого першоджерела викликає необхідність використання імуногістохімічного методу для точної верифікації гістологічної форми та можливого прогнозування агресивності перебігу. Окрім відомих прогностичних факторів p53, p16 та Ki-67 для ПР голови та шиї, також розглядається маркер циклін D1, що відіграє важливу роль в регуляції переходу від G1 до S фази мітотичного циклу в нормальних і пухлинних клітинах [139-141]. Наукові дослідження доводять, що надмірна експресія цикліну D1 в ПР голови і шиї пов'язана з поганим прогнозом для пацієнтів [142-144]. В останні роки значні зусилля онкологів також були спрямовані на дослідження ампліфікації ділянки хромосоми 11q13, що є частою мутацією в ПР різних локалізацій і проявляється, окрім інших порушень, перш за все надекспресією цикліну D1 [145].

1.4.5 Ізольована пахова аденопатія з метастазом плоскоклітинної карциноми

Ізольоване ураження пахових лімфатичних вузлів пов'язують із первинною локалізацією пухлин в малому тазу, анальному каналі, нижній частині черевної порожнини, нижніх кінцівках та більшою мірою в репродуктивній системі (вульва, піхва та шийка матки - для жінок, пеніс - для чоловіків) [146]. Аноскопія повинні проводитися у обох статей, щоб виключити ураження в аноректальній області. Виявлення первинного джерела у цих пацієнтів є важливим, оскільки потенційно лікувальна терапія доступна для карциноми вульви, піхви, шийки матки та заднього проходу навіть після їх дисемінації в регіонарні лімфатичні вузли. Але у випадку відсутності клінічних ознак джерела походження раку після ретельного обстеження, діагностичним методом вибору стає гістологічне дослідження біопсії лімфатичного вузла з додатковим ІГХ забарвленням органоспецифічними маркерами [147].

P16 специфічний маркер для ідентифікації ВПЛ-залежної цервікальної неоплазії. Інгібітор циклокінази p16 є білком, який блокує клітинний цикл

шляхом припинення фосфорилування ретінобластомного онкогену (Rb). У клітинах, інфікованих онкогенними ВПЛ, визначається гіперекспресія p16. Однак, незважаючи на це, клітини, інфіковані ВПЛ, продовжують проліферувати, тому що Rb інактивується онкобелком E7 ВПЛ.

Оскільки імуногістохімічна реакція на Ki-67 і p16 високо корелює з ВПЛ-інфекцією, виявлення цих маркерів використовують для підтвердження діагнозу у випадках підозри на інтраепітеліальне ураження високого онкогенного ризику [148]. Але у випадку метастатичних карцином жінок, p16 набуває диференціально-діагностичного значення.

За даними літератури, надекспресія p16 є безумовним показником карцином шийки матки, зустрічається частково в аденокарциномах яєчників, до 95 % карцином підшлункової залози, а також в ПР ротоглотки з ВПЛ-залежним канцерогенезом [132, 149]. Для випадкових пацієнтів, у яких не виявлено первинного вузла, остаточна місцева терапія включає видалення пахового лімфатичного вузла і / або променева терапія та іноді призводить до довготривалої виживаності. До того ж, хіміотерапія на основі платини, що проводиться одночасно з променевою терапією, покращила виживаність пацієнтів із ПР цієї області (наприклад, шийка матки, анальний отвір, сечовий міхур) [150-151]. На підставі цього, рекомендують застосовувати подібну хіміотерапію у пацієнтів і з невідомим первинним джерелом ПР.

1.4.6 Низькодиференційована нейроендокринна карцинома

Вірогідність виникнення нейроендокринної пухлини (НЕП) фактично з будь-якого органу викликає труднощі у верифікації первинного джерела за умов знаходження їх метастазів в лімфатичних вузлах або печінці. Повертаючись до історії, британський морфолог Ентони Гай Еверсон Пірс ще в 1968 році виявив в організмі людини дифузно розкидану систему високоспеціалізованих клітин, які шляхом декарбоксилювання перетворюють неактивні попередники в активні біогенні аміни або гормони [152]. Е. Пірс назвав їх

APUD-системою від перших літер англійських слів Amine Precursore Uptake and Decarboxylation. Подалі уявлення про нейроектодермальне походження APUD-цитів набуло уточнення. Таке походження відповідає лише частині ендокринних клітин (APUD-цити гіпоталамуса, епіфізу, мозкової речовини наднирників, парагангліїв). Більша частина бере початок з загальних плюрипотентних ствольових клітин, як і клітини даного органу: із ентодерми – APUD-цити ШКТ, підшлункової й ЩЗ, легень; із ектодерми – APUD-цити аденогіпофізу, шкіри тощо. [22, 153-154]. Зважаючи на подібність функції і остаточного диференціювання «дифузної ендокринної системи», тільки відмінність походження APUD-цитів допомагає встановити первинне джерело метастазів нейроендокринної карциноми [152]. Цим обумовлена актуальність пошуку органоспецифічних маркерів окрім нейроендокринних для ІГХ діагностики, таких як цитокератини.

Група протеїнів, що складають перші два класи проміжних філаментів, так звані цитокератини (СК), поряд з мікротрубочкам та мікрофіламентами складають цитоскелет більшого числа еукаріотичних клітин і використовуються в практичній онкоморфології як епітеліальні маркери диференціювання, тому що метастази часто експресують спектр СК подібний до тканини виникнення (наприклад, СК 7 часто експресується в мезотелії, одношаровому або перехідному епітелії, циліндричному епітелії жовчовивідних та панкреатичних протоків, легневих альвеол, ендометрії, ниркових збиральних трубочках, але має помірну експресію в ендокринних залозах та нейроендокринних клітинах цих локалізацій) [25, 152].

НЕК відносяться до групи сприятливих РНПЛ, але 90 % з них представлені низькодиференційованими НЕП або НЕК з градацією G3. Інші 10 % - це варіанти НЕП з градаціями G1-2 з низькою та помірною проліферацією, що за старою класифікацією називались карциноїдами (цей термін зараз зберігся лише для легень).

За даними літератури, частіше фенотип синдрому «РНПЛ» з нейроендокринним імунофенотипом знаходять у чоловіків з медіаною віку 65 років.

Метастази НЕК зустрічають найчастіше в ретроперітонеальній ділянці, середостінні й периферичних лімфатичних вузлах (40 %), печінці (25 %) та кістках (10-15 %) [153-154].

Особливості хіміотерапевтичного лікування вимагають точної верифікації РНПЛ з нейроендокринним диференціюванням. Пацієнти отримують терапію препаратами з вмістом платини або комбінацію з платини-таксану, що піднімає відсоток відповіді на лікування до 55 % (з 20 % повного регресу), а також подовжує загальну виживаність до 15 місяців з наявністю 10-15 % пацієнтів, що отримували довготривалі строки ремісії [92, 155-156].

1.4.7 Чоловіки з метастазами аденокарциноми кісток і підвищеним показником сироваткового PSA

Кістки є третім найбільш поширеним місцем метастатичного РНПЛ після лімфатичних вузлів і легенів, приблизно 10-15 % РНПЛ мають ураження скелета [157]. Фенотип РНПЛ з ураженням кісток у чоловіків теоретично може мати будь-яке походження, тому що непередбачуваний метастатичний перебіг належить до основних характеристик цього клініко-морфологічного синдрому. Наприклад, рак підшлункової залози, котрий клінічно маніфестує як РНПЛ, демонструє на 30 % частіше метастази в легенях та в 4 рази більше уражень кісток, порівняно з місцево-розповсюдженими формами карцином підшлункової залози [92].

Iwamura H. і співавт. (2014) акцентують увагу на проблемі повторної негативної біопсії передміхурової залози (ПЗ) у пацієнтів з метастатичним ураженням кісток на тлі підвищення рівня сироваткового маркера PSA (простат-специфічного антигену). Вони попри протокол, без морфологічної верифікації первинного джерела розпочали агресивну хіміотерапію та антигормональну терапію блокування андрогенів й отримали поступовий регрес онкозахворювання [158]. Такі ж самі відомості публікують і інші дослідники [159-163].

Вважається, що сироватковий PSA у спостереженнях анонімних метастазів раку простати набуває дуже важливого диференційно-діагностичного значення. Суперечливі дані опублікували Ganeshan Dh. із співавт. (2016) після дослідження 101 випадку раку ПЗ із метастазами в кістки ($n_1=83$) та без них ($n_2=18$). Вони стверджують, що 23 чоловіка з 83 пацієнтів з метастазами в кістках мали рівень сироваткового PSA взагалі в межах норми [160].

Треба відмітити, що рівень сироваткового PSA досить часто стає діагностичним орієнтиром в онкологічній практиці. В ситуаціях знаходження метастазів невідомого походження у пацієнтів з бластними ушкодженнями кісток, тільки значне підвищення сироваткового PSA нашоухне лікаря на думку про карциному ПЗ та відповідне лікування [160-163].

В фаховій літературі стосовно лікування цього фенотипу РНПЛ виділяють комбінацію проти-андрогенної терапії препаратами ряду bicalutamide та хіміотерапії з використанням zoledronic acid [157, 164]. Використання превентивної терапії з цих препаратів дозволяє підвищити відсоток виживаності чоловіків з цим діагнозом і розраховувати, попри ураження кісток, на сприятливий прогноз лікування РНПЛ [165-166].

1.4.8 Аденокарцинома з імунoproфілем товстої кишки

Метастатичні карциноми з колоректальним профілем [СК 20 (+), CDX-2 (+), СК 7 (-)] загально прийнято відносять до карцином з непоганим прогнозом для життя через ефективну систему лікувальних заходів, визначенням яких займались безліч міжнародних комітетів протягом останніх двох десятиріч для колоректального раку (КРР) (як приклад, the National Comprehensive Cancer Network Clinical Practice Guidelines in Oncology) [167].

Choi J. із співавт. (2017) провівши ІГХ дослідження 106 випадків РНПЛ з маркерами СК 20, СК 7, CDX-2, відмічають їх варіативність в карциномах різного ступеня диференціювання, що ускладнює інтерпретацію позитивних та негативних статусів цих маркерів для верифікації первинного джерела

[168]. Дослідження прогностичних ІГХ критеріїв діагностики карциноми товстої кишки надають додаткову інформацію про унікальну біологію метастатичних фенотипів з стрімкою дисемінацією. Прогностичні маркери Ki-67 та p53 зустрічаються найчастіше серед досліджень КРР. Онкопротеїн p53 відповідає за регуляцію поділу та запрограмованої смерті клітини. Блокування або зміна функції TP53 стають початковим етапом в патогенезі більшості злоякісних пухлин або лімфопроліферативних станів. Існує безліч підтверджень щодо провідної ролі мутації p53 в дисемінації КРР. Онкопротеїн p53 відмічено також як фактор дотримання цілісності ДНК. Зміна функціональної активності TP53 через структурну мутацію або мутації промотера призводить до каріотипної нестабільності, зупинці клітинного циклу на фазі G1 та ухилення від апоптозу [169]. Маркер Ki-67 в свою чергу використовується в онкоморфології для забарвлення ядер проліферуючих клітин. За даними точної цитометрії Ki-67 знаходиться у всіх фазах клітинного циклу, крім G0, з максимальною експресією у профазі та метафазі. На підставі чого з'ясували, що зростання експресії Ki-67 вірогідно говорить про збільшення мітотичної та проліферативної активності [170].

Також до вагомих диференційних критеріїв потрібно віднести експресію маркеру β -катеніну. Не зважаючи на те, що β -катенін – мембрано-цитоплазматичний протеїн міжклітинної адгезії, він виявляє функції месенжера Wnt-сигнального шляху. Під час активації Wnt-рецепторів, блокуються цитоплазматичні кінази в структурі, що називається anaphase-promoting complex (комплекс активації анафази клітини). Наступною подією є накопичення цитоплазматичного β -катеніну та його транслокації в ядро клітини. За таких умов починається транскрипція різних генів, що відповідають за проліферацію, а саме цикліну D1 [171]. Таким чином ядерна експресія β -катеніну повинна мати діагностичне значення в верифікації КРР, але на практиці дослідження цього маркеру демонструє суперечливі дані [171-172].

Маркер AMACR або протеїн p503s (alpha-methylacyl-CoA racemase) представляє собою фермент, що приймає участь в β -окисленні фрагментова-

них ланцюгових жирних кислот або їх похідних. Збільшення цитоплазматичної експресії маркера АМАСР зустрічаються в багатьох дослідженнях карцином різних локалізацій, включаючи КРР. Робота Marx A. із співавт. (2008) показує, що варіації експресії АМАСР були різними і залежали від диференціювання карцином товстої кишки, TNM стадії, наявності немущинозного варіанту КРР та локалізації в лівій половині кишківнику (кожне $p < 0,01$). Автори припустили, що зв'язок експресії АМАСР з колоректальною локалізацією пухлини може бути пов'язаний з відмінностями в обміні речовин (впливу жирних кислот), що виникають вздовж товстої кишки [173]. А робота Shi X. із співавт. (2008) підтверджують думку про те, що експресія АМАСР в КРР корелює з інвазивним ростом пухлини [174].

Роль рецепторів до епідермального фактору росту людини 2 (HER-2/neu), як біомаркеру прогнозу КРР до кінця не визначена, але його роль для таргетної терапії раків різних локалізації постійно зростає. Треба сказати, що HER-2/neu, як член родини EGFR, не зв'язується із лігандами, а активується через гетеродимерізацію з іншим ліганд-зв'язаним рецептором з утворенням найсуворіших мітогених сигналів через HER2-HER3 гетеродімер. Надекспресія HER-2/neu, яку ми визначаємо шляхом ІГХ, здебільшого пов'язана із ампліфікацією гена, яка дозволяє активацію HER2 за відсутності зв'язування лігандом іншого партнера. За даними літератури ампліфікацію HER-2/neu демонструють 13-20 % раків молочної залози, 7-34 % раків шлунку, 1,9-14,3 % раків легенів. Стосовно надекспресії HER-2/neu в КРР, дані авторів варіюють від 2 до 11 % [175].

1.4.9 Аденопатія з клітин Меркеля без первинного джерела

Карцинома з клітин Меркеля (ККМ) є рідкою злоякісною первинною неоплазмою шкіри з епітеліальним та нейроектодермальним диференціюванням. Пухлинні клітини ККМ ділять морфологічні, ІГХ та ультраструктурні особливості з диференційованими клітинами Меркеля. Але прямий гістогенез

нетичний зв'язок є недоведеним, і деякі дослідники вважають їх пухлинами з плюрипотентних клітин-попередників. Вони відносяться до шкіряних м'якотканинних неоплазій. Вперше описані в 1972 році Цирілом Токером як трабекулярна карцинома. Інші синоніми включають НЕК шкіри, первинну дрібноклітинну карциному шкіри та шкірну АПУДому. Причиною розвитку вважається ККМ-асоційований поліомавірус [176-177].

За даними ВООЗ на 2017 рік в США налічується приблизно 1500 нових випадків ККМ, що виросло від 460 спостережень за 2011 рік (таким чином, більше ніж в 3 рази за 6 років). Частіше зустрічається у чоловіків ніж у жінок ~ 2:1. ККМ дуже агресивна, більше ніж 1/3 пацієнтів із цим діагнозом помирає, що в 2 рази перевищує смертність від меланоми. Треба відзначити, що до 37 % пацієнтів мають вузлову форму, але 6-12 % презентують відділені метастази. Ці пухлини типово виникають на відкритих для сонця ділянках шкіри дорослих похилого віку (медіана віку 69 років). Анатомічне та географічне розповсюдження ККМ залежить від сонячного опромінення як головного фактору. Відносно велика поширеність цих неоплазм зустрічається у пацієнтів з хронічною імуносупресією [178-179].

Голова та шия ушкоджується в 50 %, кінцівки в 40 %. Тулуб та геніталії беруть на себе менше ніж 10 % випадків, було описано також ураження слизової. Більшість пухлин є солідними безболісними підвищеними вузлами або ущільненими бляшками червоного, фіолетового або тілесного кольору, іноді з виразкою. Більшість ККМ менше 2 см в діаметрі, що інколи ускладнює знаходження першоджерела при дисемінації процесу. Складність діагностики викликає необхідність ПГХ, а діагностичний пошук включає базальноклітинну карциному, меланому, лімфому, екрінну карциному, низькодиференційований ПР, метастатичну нейробластому, первинну PNET та метастази НЕК [180-181]. Проблемою ККМ, що обумовлює актуальність його дослідження, є висока частота локального рецидиву, регіонального метастазування в лімфатичні вузли та подальшого гематогенного і/або дистанційного лімфогенного розповсюдження.

Резюме. Найбільшу діагностичну проблему з визначення джерела походження низькодиференційованих та недиференційованих (анапластичних) пухлин складають метастатичні карциноми, що є клініко-морфологічним синдромом «Раки невідомої первинної локалізації» з різною категорією верифікації (попередні або підтвержені карциноми з невідомого джерела). Ретельне дослідження механізмів канцерогенезу сприятливих фенотипів клініко-морфологічного синдрому «Раки невідомої первинної локалізації», що мають трохи кращий прогноз, повинно поглибити розуміння біології цього онкологічного феномену для розробки оптимальних алгоритмів ведення таких пацієнтів та можливого розширення діапазону терапевтичних заходів.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Матеріали 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 ший (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 випадок РНПЛ для FISH дослідження (рис. 2.1).

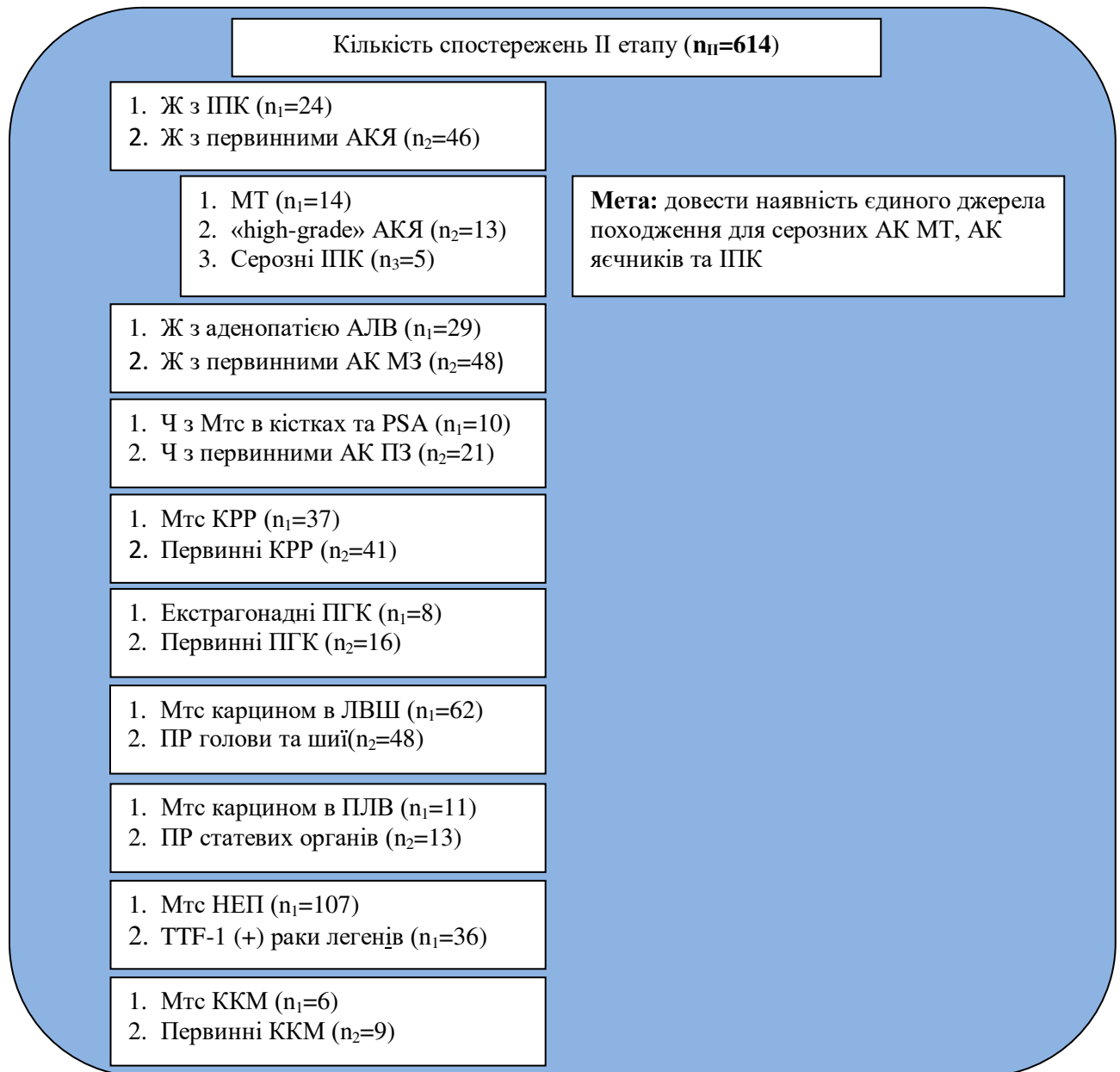
Загальна кількість спостережень (n=716)		
I етап	n_I=41 Неопластичні ураження ЛВШ різного гістогенезу (n _I =41)	Мета: МФМ пухлин різного гістогенезу в ImageJ; формування МФМ критеріїв відносно розмірів звичайних лімфоцитів
II етап	n_{II}=614 1. Сприятливі імунофенотипи РНПЛ 2. Еталонні групи порівняння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

Рисунок 2.1 – Загальний дизайн дослідження.

Для з'ясування морфометричних (МФМ) параметрів пухлин різного гістогенезу на першому етапі було проведено ретроспективне дослідження 41 випадку неопластичних уражень ЛВШ без інших клінічних маніфестацій первинної локалізації. Середній вік пацієнтів склав $47,68 \pm 16,41$ років.

Окремо було досліджено 10 біоптатів ЛВШ без пухлинного ураження для з'ясування розмірів звичайних лімфоцитів в якості еталону МФМ. Зразки були взяті з архіву морфологічного відділу лікувально-діагностичного центру ТОВ «Аптеки медичної академії» (м. Дніпро) в період серпень 2016 р. - липень 2017 р.

На другому етапі було проведено ретроспективний аналіз клінічних (стать, вік), гістологічних, ІГХ та МФМ біопсійного / операційного матеріалу дев'яти сприятливих імунофенотипів клініко-морфологічного синдрому РНПЛ та порівняно їх характеристики з подібними первинними місцево-розповсюдженими пухлинами (рис. 2.2):



Примітка. Ж – жінки, Ч – чоловіки, Мтс – метастази.

Рисунок 2.2 – II етап дослідження.

➤ 24 спостережень жінок з ізольованим папілярним канцероматозом очеревини, віком від 28 до 81 років (середній вік $56,29 \pm 14,68$ років) та 46

випадків операційного матеріалу первинних аденокарцином яєчників жінок, віком від 27 до 76 років (середній вік $52,17 \pm 12,72$ років);

➤ для з'ясування походження серозних перитонеальних карцином, було досліджено матеріал 31 жінок, від 28 до 76 років (середній вік $57,32 \pm 11,54$ років), що були розподілені на три групи: 14 маткових труб (8 маткових труб без патологічних змін та 6 з ознаками інтраепітеліальної неоплазії), 13 серозних «high-grade» аденокарцином яєчників та 5 метастатичних перитонеальних карцином серозного типу;

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

➤ 10 чоловіків з метастазами карцином в кістки без первинної локалізації та підвищенням сироваткового маркера PSA, віком від 43 до 57 років (середній вік $50,00 \pm 9,89$ років) та 21 спостереження операційного матеріалу чоловіків з первинними карциномами передміхурової залози, 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 [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 випадок (24 жінки та 17 чоловіків) операційного матеріалу пацієнтів з первинними АК товстої кишки, віком від 27 до 76 років (середній вік $60,56 \pm 12,81$ років);

➤ 8 пацієнтів (7 чоловіків та 1 жінка) з екстрагонадними пухлинами з герміногенних клітин (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 герміногенними пухлинами 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 ло-

калізацій голови та шиї (29 гортані, 14 ротоглотки, 10 синусів верхньої щелепи, 4 шкіри обличчя, 1 нижня губа), 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 ізольований паховий лімфатичний вузол, 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 статтевого 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 нейроендокринних пухлин без первинної локалізації віком від 19 до 85 років (середній вік $58,78 \pm 11,58$ років) та 36 біоптатів TTF-1 (+) карцином легенів (10 жінок та 26 чоловіків) віком від 29 до 81 років (середній вік $58,03 \pm 10,83$ років);

➤ 6 пацієнтів (4 чоловіка та 2 жінки) з ізольованими метастазами карциноми з клітин Меркеля без первинного джерела, 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 ККМ шкіри (4 ділянки щік, 3 в області стегна, 1 шкіра гомілки та 1 – передпліччя), пацієнтів, віком від 27 до 76 років (середній вік $52,17 \pm 12,72$ років).

Для третього етапу було відібрано біопсійний або операційний матеріал 61 пацієнта (34 жінки та 27 чоловіків) віком від 26 до 74 років (середній вік $53,4 \pm 11,42$ років) з верифікованим первинним діагнозом РНПЛ та визначеним імунофенотипом на другому етапі дослідження (табл. 2.1).

З 61 спостереження РНПЛ, 3 (4,9 %) були герміногені пухлини екстрагонадного розташування (2 семіноми/герміноми середостіння та 1 ембріональна карцинома заочеревинного простору); 6 (9,8 %) ІПК (5 серозних естроген-залежних АК та 1 муцинозна естроген-залежна АК); 5 (8,2 %) метастазів в аксиллярні лімфатичні вузли у 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 без органоспецифічних ознак (для однорідності групи всі відібрані спостереження були із печінки); 4

(6,5 %) метастази в кістки у чоловіків з підвищенням сироваткового маркера PSA, 9 (14,7 %) метастазів з колоректальним фенотипом [СК 20 (+), CDX-2 (+), СК 7 (-)]; та 3 (4,9 %) карциноми з клітин Меркеля. Таким чином серед гістологічних форм відібраних РНПЛ найчисельнішою виявилась група АК 26 (42,6 %) (табл. 2.1).

Таблиця 2.1 - Характеристика клініко-морфологічних даних пацієнтів III етапу дослідження, n (%)

Характеристики	n (%)
Стать: чоловіки	34 (55,7 %)
жінки	27 (44,3 %)
Вік: середнє ± стандартне відхилення (53,4±11,42)	
Локалізація пухлин:	
середостіння	2 (3,3 %)
заочеревинний простір	1 (1,6 %)
канцероматоз очеревини	8 (13,1 %)
аксиллярні лімфатичні вузли	6 (9,8 %)
лімфатичні вузли шиї	12 (19,7 %)
пахові лімфатичні вузли	11 (18,0 %)
кістки	4 (6,5 %)
печінка	13 (21,3 %)
яєчники	4 (6,5 %)
Імунофенотипи за Vajdic SM, Goldstein D., (2015) [10]:	
герміногенні пухлини екстрагонадного розташування	3 (4,9 %)
жінки з ізольованим папілярним канцероматозом	6 (9,8 %)
жінки з метастазами АК в АЛВ	5 (8,2 %)
метастази ПР в ЛВШ	12 (19,7 %)
ізольована пахова аденопатія (ПР)	9 (14,7 %)
низькодиференційована нейроендокринна карцинома	10 (16,4 %)
чоловіки з метастазами кісток і підвищенням PSA	4 (6,5 %)
колоректальна аденокарцинома (СК20+,СК7-,CDX-2+)	9 (14,7 %)
аденопатія з клітин Меркеля невідомого походження	3 (4,9 %)
Гістологічна форма	
семінома/гермінома	2 (3,3 %)
ембріональна карцинома	1 (1,6 %)
аденокарцинома (помірно-, низькодиференційована)	26 (42,6 %)
плоскоклітинна карцинома	19 (31,1 %)
нейроендокринна карцинома (низькодиференційована)	10 (16,4 %)
карцинома з клітин Меркеля	3 (4,9 %)

2.2 Методи дослідження

Відповідно до мети і завдань дослідження був використаний комплекс морфологічного, морфометричного, імуногістохімічного, FISH методів та статистичного аналізу отриманих результатів.

Морфологічний метод. Для виготовлення гістологічних препаратів, які підлягали морфологічному дослідженню, з отриманих парафінових блоків, попередньо охолоджених, були виготовлені на мікротомі Microm HM-340 зрізи товщиною 4 мкм, які насаджувалися на скельця та висушувалися для збільшення адгезії із поверхнею скельця. Подальші етапи включали депарафінізацію в орто-ксилолі, регідратацію у батареї спиртів та забарвлення за стандартною методикою гематоксиліном та еозином [182]. Мікроскопічне дослідження готових препаратів проводилося на світловому мікроскопі Zeiss Primo Star із використанням об'єктивів $\times 20$, $\times 40$, $\times 100$.

Цифрова морфометрія. Для морфометричного методу використовувалась камера мікроскопу Zeiss Primo Star - AxioCam ERC 5s з ліцензованим програмним забезпеченням ZEN 2 blue edition. Отримані інформативні поля зору (пухлинна тканина займала не менше 65% поля зору) були зафіксовані 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 рекомендованим алгоритмом [183-184]:

(1) калібрування мікрофотографій за допомогою еталонної сітки з розміром комірки 90мкм \times 90мкм, що спочатку була зафіксована в полістиролі, як гістологічний препарат, та сфотографована камерою мікроскопу Zeiss Primo Star - AxioCam ERC 5s в однакових умовах з зрізами пухлин, забарвлених гематоксиліном та еозином, для цього виконували розрахунок масштабу

ного коефіцієнта – трансформували довжину відомої комірки 90 мкм в пікселі *Analyse>Set Scale* (рис. 2.3);

(2) вимірювання площі, периметру, «коефіцієнту круглості» ядер, зберігання інформації та первинна статистична обробка результатів вимірювання (розраховували мінімальне, максимальне, середнє арифметичне та стандартне відхилення) *Analyse>Tools>ROI Manager>Measure* (рис. 2.4).

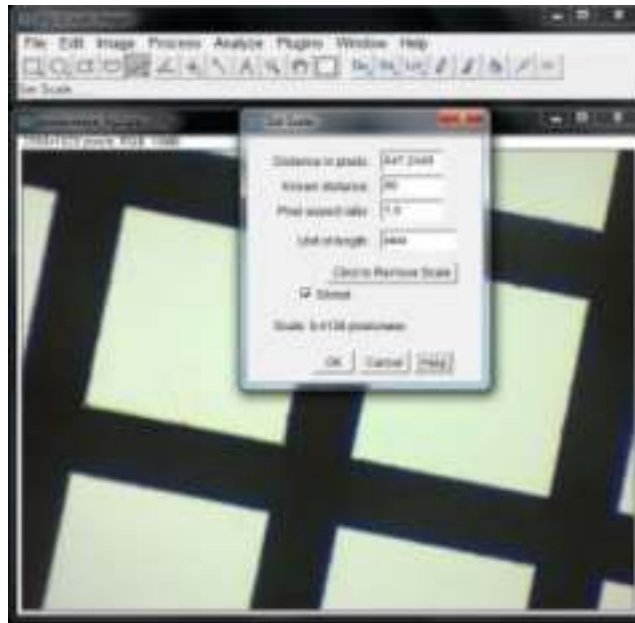


Рисунок 2.3 – Розрахунок масштабного коефіцієнту за допомогою еталонної сітки з розміром комірки 90 мкм × 90 мкм в програмі ImageJ.

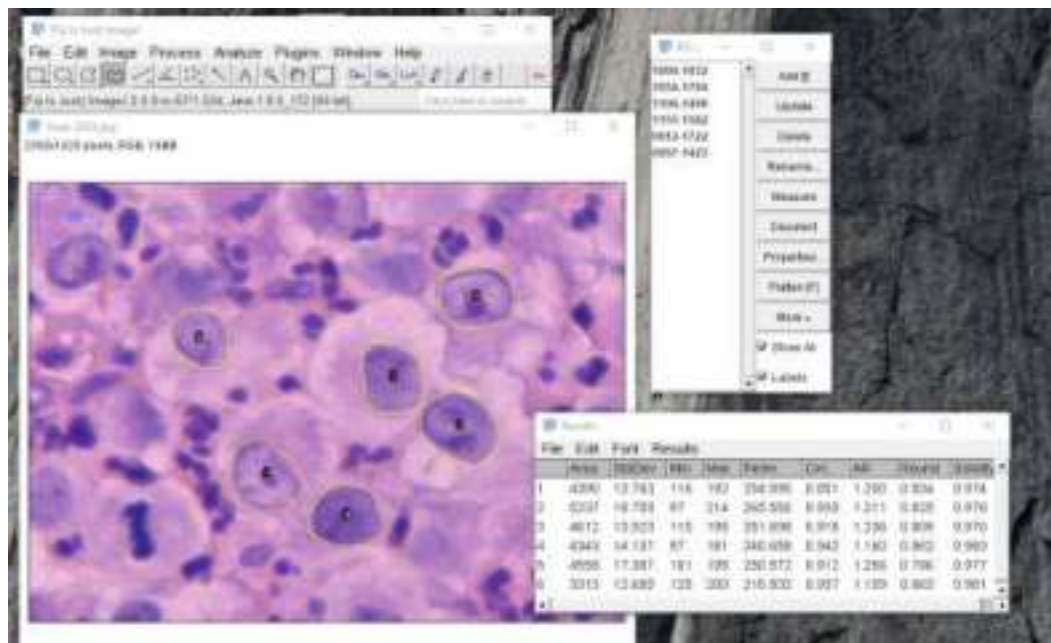


Рисунок 2.4 – Вимірювання морфометричних показників ядер семіноми програмою ImageJ (площі, периметру, «коефіцієнту круглості».

Також, для розрахунку виключно інтрануклеарних реакцій маркерів CDX-2, WT-1, p63, p16, PGR, p53, TTF-1, ER, AR, в тому числі й індексу проліферації за Ki-67 в програмі ImageJ використовували автоматизований плагін ImmunoRatio [185-186]. Плагін дозволив одночасно аналізувати декілька мікрофотографій одного препарату, в результаті чого автоматично розраховувалось середнє значення інтрануклеарної експресії у відсотках (рис. 2.5).

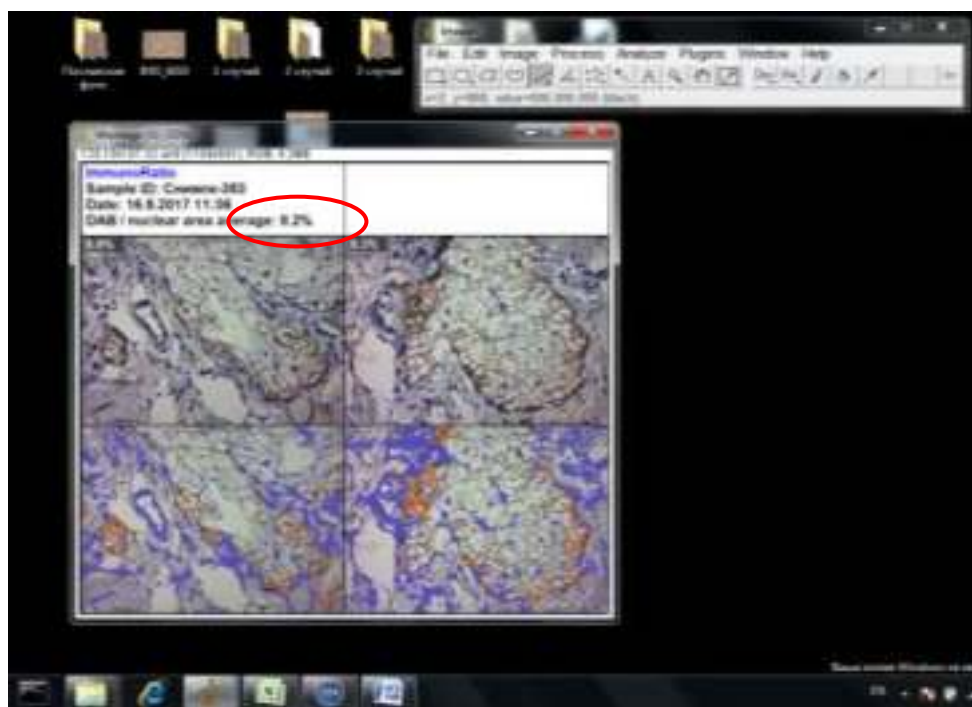


Рисунок 2.5 – Автоматичний розрахунок індексу проліферації за Ki-67 плагіном ImmunoRatio в програмі ImageJ (зведене зображення, що містить вихідні фотографії (верхній ряд), проаналізовані сегментовані зображення (нижній ряд) та середній рівень індексу проліферації (вказаний в верхньому лівому куті червоним овалом), який відповідає значенню DAB/ nuclear area average».

Імуногістохімічний метод. ІГХ дослідження проводилось згідно протоколів компанії ThermoScientific (TS), (США). Парафінові зрізи завтовшки 4 мкм інформативних блоків наносили на спеціальні адгезивні предметні скельця SuperFrost Plus. Після депарафінізації та регідратації зрізів проводили епітопне повернення антигенів та пригнічення ендогенної пероксидази. Інкубація зрізів з первинними антитілами у вологих камерах при температурі 23 – 25⁰С проводилась на протязі 30 хвилин. Візуалізації Lab Vision Quanto (TS, США) з виявленням білкового ланцюга за допомогою DAB Quanto

Chromogen (TS, США). Характеристики моноклональних антитіл ІГХ панелей занесені в таблиці 2.2, 2.3, 2.4.

Таблиця 2.2 – Моноклональні антитіла первинної імуногістохімічної панелі

Первинні антитіла	Клон (розведення)	Локалізація специфічної реакції
Pan Cytokeratin (Pan CK AE1/3)	AE1/AE3(1:200)	Цитоплазма
Vimentin	V9 (1:250)	Цитоплазма
CD45	Ab-3 (1:200)	Мембрана
S100	Ab-1 (1:100)	Цитоплазма
HMB 45	Ab-1 (1:150)	Цитоплазма

Таблиця 2.3 – Моноклональні антитіла вторинної імуногістохімічної панелі для другого етапу дослідження

Первинні антитіла	Клон (розведення)	Локалізація специфічної реакції
1	2	3
<i>Для фенотипів аденокарцином</i>		
CA-125 (carbohydrate antigen 125 або mucin 16)	Ab-1 (1:10)	Мембрана
PAX-8 (paired box 8)	MRQ-50 (1:100)	Ядро
CK 7 (Cytokeratin 7)	RCK105 (1:100)	Цитоплазма
CK 20 (Cytokeratin 20)	Ks 20.8 (1:100)	Цитоплазма
p16 ^{INK4A}	DCS 240 (1:50)	Ядро + цитоплазма
WT-1 (Wilms tumor protein – 1)	Ab-1 (1:500)	Ядро
Calretinin	sp13 (1:200)	Цитоплазма
ER (estrogen receptors)	sp1 (1:400)	Ядро
PGR (progesterone receptors)	YR85 (1:200)	Ядро
p53	Ab-3 (1:100)	Ядро
HER-2/neu (human epidermal growth factor receptor-2)	Ab-1 (1:100)	Мембрана
CDX-2 (caudal type homeobox 2)	EPR27649 (1:100)	Ядро
Ki-67	sp6 (1:250)	Ядро
PSA (prostate-specific antigen)	EP1588Y(1:200)	Цитоплазма
CK 8/18 (Cytokeratin 8/18)	Ab-2(K8.8+DC10) (1:100)	Цитоплазма
AR (androgen receptors)	RB-9030-PO (1:100)	Ядро
AMACR (p504s) (alpha-methylacyl-CoA racemase)	13H4 (1:100)	Мембрана

Продовження таблиці 2.3

1	2	3
β-катенін	Ab-1 (1:200)	Ядро + цитоплазма
<i>Для фенотипів неаденогенних карцином</i>		
PLAP (placental alkaline phosphatase)	Ab-4 (Clone 8A9) (1:80)	Мембрана
CD117	Ab-3 (Clone K45) (RTU)	Мембрана + цитоплазма
HCG (Chorionic Gonadotropin, Human)	Ab-5 (Clone CG04 + CG05) (RTU)	Цитоплазма
αFP (alpha fetoprotein)	Rabbit Polyclonal Antibody (1:1000)	Цитоплазма
CD30 (Reed-Sternberg Cell Marker)	Ab-1 (Clone Ber-H2) (1:40)	Мембрана + цитоплазма
EMA (epithelial membrane antigen)	Ab-3 (Clone E29) (1:800)	Мембрана + цитоплазма
CK HMW (cytokeratin high molecular weight)	Ab-3 (34bE12) (1:50)	Цитоплазма
p63	4A4 (1:400)	Ядро
p16 ^{INK4A}	DCS 240 (1:50)	Ядро + цитоплазма
TTF-1 (thyroid transcription factor – 1)	Ab-1 (1:200)	Ядро
CK 20 (Cytokeratin 20)	Ks 20.8 (1:100)	Цитоплазма
Chromogranin A	sp12 (1:400)	Цитоплазма
Synaptophysin	sp11 (1:200)	Цитоплазма
Ki-67	sp6 (1:250)	Ядро

Таблиця 2.4 – Моноклональні антитіла імуногістохімічної панелі для третього етапу дослідження

Первинні антитіла	Клон (розведення)	Локалізація специфічної реакції
p16 ^{INK4A}	DCS 240 (1:50)	Ядро + цитоплазма
HER-2/neu (human epidermal growth factor receptor-2)	Ab-1 (1:100)	Мембрана

Для кожного маркера виконували контрольні дослідження з метою виключення помилково-позитивного чи помилково-негативного результатів. В якості позитивного контролю паралельно забарвлювалися зрізи пухлини та тканини, де необхідний антиген був присутній в достатній мірі. Для негатив-

ного контролю на одному із зрізів пухлини виключали інкубацію з первинним антитілом. Диференційоване фарбування тканини само по собі слугувало внутрішнім контролем (наприклад, негативна реакція строми і судин при позитивній реакції паренхіми, або навпаки).

Оцінювання позитивних статусів за експресією маркерів першого та другого етапу дослідження проводилось в залежності від типу та локалізації пухлини за рекомендаціями Fletcher C. D. M. (2013) [22], Туффаха М. С. А., Гичка С., Гуски Г., Кристиансен Г. (2018) [25], Dabbs D. J. (2010) [80].

Для оцінки ІГХ реакції з p16^{INK4A} та HER-2/neu на третьому етапі дослідження користувались рекомендаціями різних авторів в залежності від імунотипу (інформацію подано у відповідному розділі).

Флуоресцентна in situ гібридизація (FISH) виконувалась за протоколом виробника ZytoVision GmbH (Німеччина) на базі морфологічної лабораторії ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України». В дослідженні використовували локус-специфічні зонди, які зв'язувались лише з частинами послідовностей нуклеїнових кислот із високим ступенем компліментарності. 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 під флуоресцентним мікроскопом Axio ImagerA2 (Carl Zeiss, Німеччина). Брали до уваги тільки окремі і добре окреслені клітини. Перемішані між собою клітини були виключені з аналізу. Кожну пухлину оцінювали на наявність гена p16^{INK4A} (CDKN2A) в хромосомі 9 (CEN 9). Гомозиготний тип було визначено, якщо обидва сигнали 9p21 були втрачені.

Статистичний аналіз даних проводили в 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 середніх значень морфометричних показників «площа», «периметр» та «круглість ядер», що були отримані в програмі обробки цифрових зображень ImageJ за вище вказаним алгоритмом, на першому етапі, за допомогою критерію Шапіро-Вілка перевірялась відповідність розподілу показника у кожній групі на нормальність. Статистика критерію критерію має вигляд

$$W = \frac{1}{s^2} [\sum_{i=1}^n a_{n-i+1} (x_{n-i+1} - x_i)]^2, \quad (2.1)$$

де коефіцієнти a_{n-i+1} беруться з таблиці, при великих значеннях n використовується апроксимація за алгоритмом Royston P. [187]. Нульова гіпотеза про відповідність розподілу нормальному відхилялась при $p < 0,05$.

У випадку відмінності розподілу від нормального, для перевірки відмінності середніх значень використовувався непараметричний критерій Манна-Уїтні.

$$U = n_1 \times n_2 + \frac{n_x \times (n_x + 1)}{2} - T_x, \quad (2.2)$$

де n_1 – кількість одиниць в першій виборці, n_2 – кількість одиниць в другій виборці, T_x - більша із двох рангових сум, що відповідає виборці з кількістю одиниць n_x .

Нульова гіпотеза про однаковість середніх значень відкидалася за умови, що отримане значення U менше критичного значення критерію за таблицею або рівно йому для рівня статистичної значущості 0,05. Якщо U більше критичного значення критерію за таблицею приймається нульова гіпотеза, достовірність різниці між величинами тим більше, чим менше значення U .

Для вибірок з нормальним розподілом, для порівняння середніх значень використано t-критерій Стюдента. При цьому проводилася перевірка

рівності дисперсій двох вибірок за допомогою F-тесту (критерію Фішера). Статистика критерію має вигляд

$$F = \frac{s_A^2}{s_B^2} \quad (2.3)$$

Нульова гіпотеза про рівність дисперсій приймалася якщо p для значення F більше ніж встановлений критичний рівень значущості 0,05.

У випадку рівності дисперсій у двох групах, використовувався стандартний t-критерій Стьюдента

$$t = \frac{\bar{x}_A - \bar{x}_B}{\sqrt{\frac{s^2}{n_A} + \frac{s^2}{n_B}}} \quad (2.4)$$

де \bar{x}_A та \bar{x}_B – середнє значення груп А і В відповідно, n_A та n_B – розміри груп А і В відповідно, s^2 – оцінка об'єднаної дисперсії двох груп, яка обчислюється як:

$$s^2 = \frac{\sum(x - \bar{x}_A)^2 + \sum(x - \bar{x}_B)^2}{n_A + n_B - 2} \quad (2.5)$$

зі ступенями свободи: $df = n_A + n_B - 2$.

Якщо дисперсії двох груп, що порівнюються, різні, використовувався адаптований t-критерій Стьюдента.

$$t = \frac{\bar{x}_A - \bar{x}_B}{\sqrt{\frac{s_A^2}{n_A} + \frac{s_B^2}{n_B}}} \quad (2.6)$$

де, s_A^2 і s_B^2 – стандартне відхилення двох груп А і В, відповідно.

Кількість ступенів свободи оцінюються наступним чином :

$$df = \left(\frac{s_A^2}{n_A} + \frac{s_B^2}{n_B} \right) / \left(\frac{s_A^4}{n_A^2(n_A-1)} + \frac{s_B^4}{n_B^2(n_B-1)} \right) \quad (2.7)$$

Для відповідного значення статистики t розраховувалося значення p . Нульова гіпотеза про рівність середніх у двох групах відхилялася якщо значення p було більше встановленого рівня значущості 0,05.

Встановлення достовірності міжгрупових зв'язків за кількісним розподілом проводилося за допомогою точного тесту Фішера, що використовується для перевірки статистичної значущості зв'язку між двома номінальними змінними. На відміну від Хі-квадрату тест Фішера є точним та може викори-

стовуватися в морфологічних дослідженнях з невеликим об'ємом спостережень та незалежно від відповідності вибірки нормальному закону розподілу.

Статистика критерію виглядає так: існують дві змінні X та Y , з m і n спостережуваними станами, відповідно. Елемент a_{ij} матриці $m \times n$ відповідає кількості спостережень при $x=i$ та $y=j$. Розраховуються R_i та C_j суми відповідних рядків та стовпців і загальна сума матриці

$$N = \sum_{i=1}^m R_i = \sum_{j=1}^n C_j. \quad (2.8)$$

Потім обчислюється умовна ймовірність

$$P = \frac{(R_1!R_2! \cdots R_m!)(C_1!C_2! \cdots C_n!)}{N! \prod_{ij} a_{ij}!}. \quad (2.9)$$

При $P < 0.05$ нульова гіпотеза відхилялась і вважалось, що відмінність між групами є достовірною.

Також для маркерів з виключно інтрануклеарною експресією автоматизованим плагіном ImmunoRatio в програмі ImageJ були розраховані середні значення експресії:

- індекс проліферації за Ki-67 (%), $\bar{x} \pm S_x$;
- індекс експресії WT-1 (%), $\bar{x} \pm S_x$;
- індекс експресії CDX-2 (%), $\bar{x} \pm S_x$;
- індекс експресії p63 (%), $\bar{x} \pm S_x$;
- індекс експресії TTF-1 (%), $\bar{x} \pm S_x$;
- індекс експресії ER (%), $\bar{x} \pm S_x$;
- індекс експресії AR (%), $\bar{x} \pm S_x$;
- індекс експресії PGR (%), $\bar{x} \pm S_x$;
- індекс експресії p16^{INK4a} (%), $\bar{x} \pm S_x$;
- індекс експресії p53 (%), $\bar{x} \pm S_x$;

Дані вище наведених ІГХ досліджень, зазнавали статистичної обробки, з використанням варіаційних методів, що включали визначення наступних характеристик: \bar{x} – середня арифметична; s_x^2 – дисперсія; s_x – середнє квад-

ратичне відхилення; C_v – коефіцієнт варіації; s_s – помилка середнього квадратичного відхилення, для обчислення, як були використані стандартні формули [188]:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i ; \quad (2.10)$$

$$s_x^2 = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n} ; \quad (2.11)$$

$$s_x = \sqrt{s_x^2} ; \quad (2.12)$$

$$C_v = \frac{s_x}{\bar{x}} \cdot 100 ; \quad (2.13)$$

$$s_s = \frac{s_x}{\sqrt{2n}} , \quad (2.14)$$

де n – об'єм вибірки; x_i – варіанти вибірки.

Отже, представлені в цьому розділі матеріали й методи дослідження є послідовними кроками на шляху вирішення поставлених задач, що дозволяють здійснити комплексний підхід до покращення діагностичних підходів верифікації недиференційованих (анапластичних) пухлин та пухлин без відомої первинної локалізації.

РОЗДІЛ 3

ОПТИМІЗАЦІЯ ІМУНОГІСТОХІМІЧНИХ АЛГОРИТМІВ ВЕРИФІКАЦІЇ ПОХОДЖЕННЯ МЕТАСТАТИЧНИХ ПУХЛИН ШЛЯХОМ МОРФОМЕТРИЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ ЯДЕР КЛІТИН ПУХЛИН РІЗНОГО ГІСТОГЕНЕЗУ

Ідентифікація метастатичних злоякісних новоутворень починається з аналізу морфології пухлинних клітин, порівняно із навколишнім реактивним середовищем. За умови метастазування в лімфатичні вузли, саме звичайні лімфоцити (ЗЛ) мікрооточення стають відносним еталоном розміру пухлинних клітин при морфологічному дослідженні. Завдяки використанню програми для аналізу цифрових зображень ImageJ ці інтуїтивні вимірювання «на око» стало можливим перевести в кількісні показники.

Для визначення «еталонних розмірів» на мікрофотографіях зрізів лімфатичних вузлів шийї (ЛВШ) з кортикальною гіперплазією (10 зразків без непластичного ушкодження), забарвлених гематоксиліном і еозином, в програмі ImageJ були визначені морфометричні (МФМ) параметри «площа», «периметр», «коефіцієнт круглості» ЗЛ з метою подальшого порівняння їх розмірів із розмірами неопластичних клітин. Треба зауважити, що говорячи про розміри клітин, ми маємо на увазі розміри ядер, через наявність тільки у них чітких меж на світлооптичному рівні в забарвленні гематоксиліном і еозином. Показник «площа» ядра клітин об'єктивно демонстрував відношення пухлин до категорій «дрібно-» або «великоклітинні» (на наш погляд, існуючий еталон розміру у вигляді подвійного розміру еритроцитів у мазках, висушених на повітрі, для практичного використання в оцінці розмірів клітин пухлин є малоефективним). Стандартне відхилення (SD) показника «площа» показувало який поліморфізм розмірів присутній (чим більше SD, тим більша різниця між найменшими та найбільшими клітинами). «Периметр» – це показник поверхні ядерної мембрани, що може описати наявність інвагінацій або випинань, які є якісними характеристиками морфології пухлин. «Коефіцієнт

круглості» давав інформацію про форму ядра (чим ближчий він до одиниці, тим круглішим є об'єкт вимірювання). Поєднання трьох цих показників надає вичерпну інформацію про варіант відмінності ядер пухлинних клітин, порівняно із ядрами вибраного нами еталону ЗЛ ЛВШ (табл. 3.1, рис. 3.1).

Таблиця 3.1 – Показники морфометричного дослідження звичайних лімфоцитів лімфатичних вузлів шиї в програмі ImageJ, мкм^2 , мкм

Показники морфометрії лімфоцитів ЛВШ	Площа (мкм^2)	Периметр (мкм)	Коефіцієнт круглості (параметр ImageJ)
Середнє значення (M)	16,74	15,99	0,75
Стандартне відхилення (SD)	2,69	1,54	0,09
Мінімальне значення (Min)	11,71	13,13	0,51
Максимальне значення (Max)	23,03	19,01	0,93

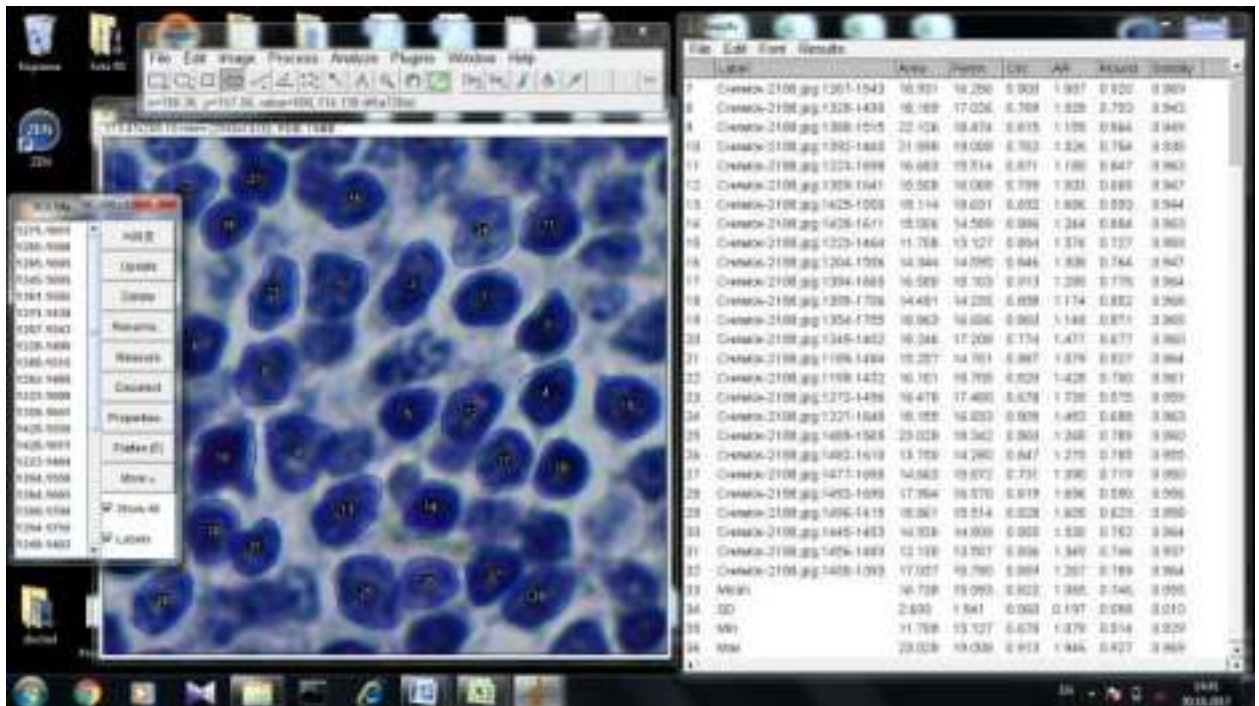


Рисунок 3.1 – Визначення параметрів ядер звичайних лімфоцитів тканини лімфатичного вузла шиї в програмі ImageJ на мікрофотографії із забарвленням гематоксиліном і еозином та збільшенням $\times 400$.

Аналізуючи дані таблиці 3.1, відзначаємо дрібні за площею $16,74 \pm 2,69 \text{ мкм}^2$ (від 11,71 до $23,03 \text{ мкм}^2$) та периметром $15,99 \pm 1,54 \text{ мкм}$ (від 13,13 до 19,01 мкм), більшою мірою однакові (стандартне відхилення показника

«площа» менше 3), помірної круглості клітини $0,75 \pm 0,09$ (від зовсім круглих з показником 0,93 до веретеноподібних – 0,51 (стовпчик Round). На рис. 3.1 видно, що ядерні мембрани інколи мають невеликі вип'ячування та неоднорідність хроматину. Ядра ЗЛ подібні між собою за розмірами та формою, розташовані щільно, що говорить про мізерну цитоплазму навколо. Таким чином, гістологічні особливості та морфометричні показники ЗЛ таблиці 3.1 будуть еталонними в цифровій морфометрії метастазів пухлин без первинної локалізації для описання морфології та групування злоякісних пухлин за розмірами та круглістю ядер клітин.

Для стандартизації умов метастазування ретроспективно було відібрано 41 спостереження неопластичного ураження ЛВШ з верифікованими діагнозами гістологічним та ІГХ методом.

На початку дослідження всі вони відносились до 1 категорії верифікації за клінічною ознакою – ізольоване ураження ЛВШ без інших верифікованих осередків. З метою розподілу відібраних спостережень за лінією детермінації була проаналізована первинна панель ІГХ маркерів: коктейль цитокератинів Pan CK AE1/3 (епітеліальне походження), загальний лейкоцитарний антиген CD45 (гемопоестичне), проміжний філамент Vimentin (мезенхімальне), маркер походження з нервового гребеня S100 і/або HMB45 (меланоцитарне).

Первинна панель ІГХ дослідження [Pan CK AE1/3, Vimentin, CD45, S100 і/або HMB45] виявила 5 відмінних за комбінацією ІГХ маркерів варіантів неопластичних процесів, в яких перші два фенотипи з позитивним маркером епітеліальної диференціації Pan CK AE1/3 відносяться до 2 категорії верифікації «попередній РНПЛ»:

- 1) 10 із 41 (24,39 %) [Pan CK AE1/3 – позитивних (+), Vimentin – строго негативних (-), CD45 (-) – негативних, S100 і/або HMB45 (-) – негативних];
- 2) 4 із 41 (9,8 %) [Pan CK AE1/3 – позитивних (+), Vimentin - позитивних (+), CD45 (-) – негативних, S100 і/або HMB45 (-) – негативних];

- 3) 23 із 41 (56,10 %) [Pan CK AE1/3 – негативних (-), Vimentin - частково позитивних (+/-), CD45 (+) – позитивних, S100 і/або HMB45 (-) – негативних];
- 4) 2 із 41 (4,88 %) [Pan CK AE1/3 – негативних (-), Vimentin – строго позитивних (+), CD45 (-) – негативних, S100 і/або HMB45 (+) – позитивних];
- 5) 2 із 41 (4,88 %) [Pan CK AE1/3 – негативних (-), Vimentin – строго позитивних (+), CD45 (-) – негативних, S100 і/або HMB45 (-) – негативних].

3.1 Морфометричне дослідження [Pan CK AE1/3 позитивних] метастазів пухлин невідомої первинної локалізації в лімфатичні вузли шиї – імунофенотипи метастатичних карцином

Перші два фенотипи [Pan CK AE1/3 (+)] метастазів (14 із 41, 34,15 %) характеризувались класичною «епітеліальною» морфологією, круглі або овальні форми клітини, які формували «гнізда» та мали виражену стромальну десмопластичну реакцію, а також судини, що розподіляли пухлинну паренхіму на групи подібних клітин. [Pan CK AE1/3 (+)] варіанти розділились на [Vimentin строго негативні (-)] (10 з 14, 71,4 %) та [Vimentin позитивні (+)], або частково позитивні (+/-) (4 з 14, 28,6 %).

За МФМ показниками ядер клітин варіанту [Pan CK AE1/3 – позитивних (+), Vimentin – строго негативних (-), CD45 (-) – негативних, S100 (-) – негативних] можна було виділити 3 характерні підгрупи.

1.1. Підгрупа (1 із 10 спостережень) демонструвала некрупні ядра, які лише в 1,5 – 1,7 разів перевищували розміри ядер звичайних лімфоцитів ЛВШ і мали деякі труднощі з виявлення дисемінованих клітин серед лімфоїдного середовища. Поліморфізм клітин та інвазивний характер розташування осередків метастатичної карциноми, відмінність в розподілі хроматину, наявність рясної цитоплазми, переодичність патологічних мітозів, на відміну від МФМ розмірів ядер, були корисними в діагностиці (табл. 3.2, рис. 3.2 А).

Таблиця 3.2 – Показники морфометричного дослідження підгрупи 1.1 [Pan СК AE1/3 (+), Vimentin (-)] метастаза дрібноклітинної карциноми в лімфатичні вузли шиї програми ImageJ, мкм², мкм

Показники морфометрії неопластичних клітин	Площа (мкм ²)	Периметр (мкм)	Коефіцієнт круглості (параметр ImageJ)
Середнє значення (M)	29,21	21,85	0,66
Стандартне відхилення (SD)	6,90	2,65	0,12
Мінімальне значення (Min)	19,25	17,16	0,44
Максимальне значення (Max)	42,88	27,01	0,90

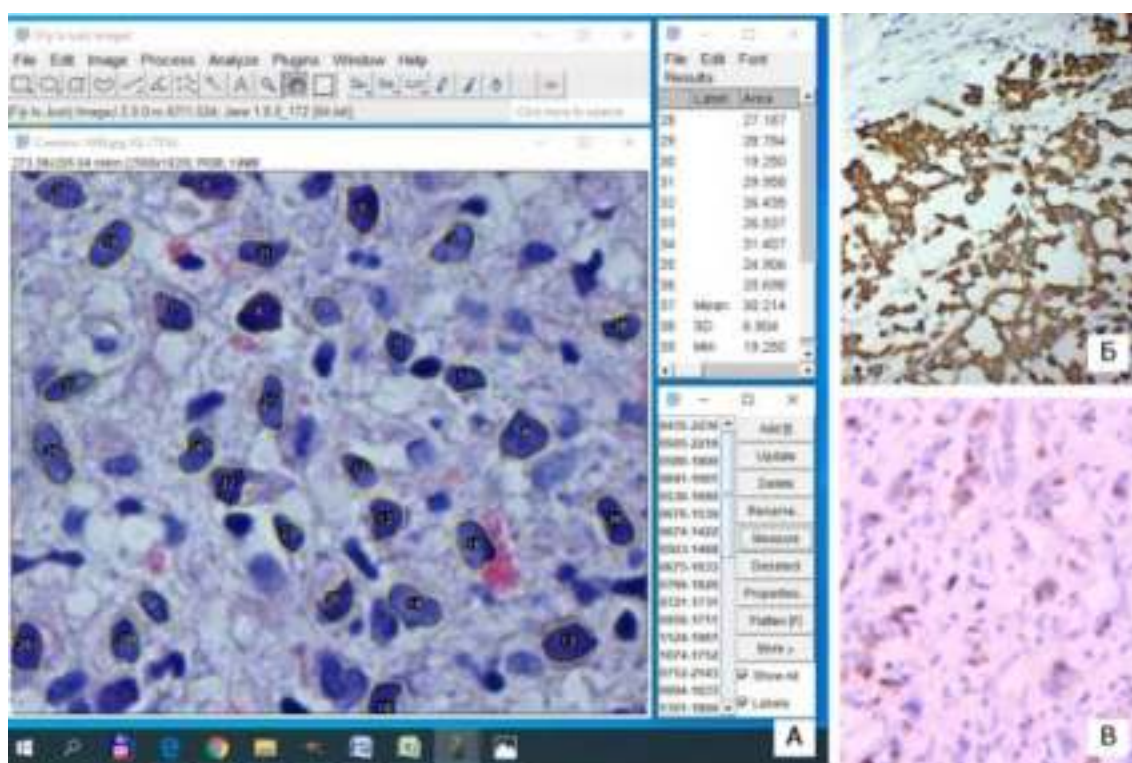


Рисунок 3.2 – А. Визначення МФМ параметрів ядер метастазу дрібноклітинної карциноми в програмі ImageJ, мікрофотографія із забарвленням гематоксилином і еозином. Б. Позитивна цитоплазматична експресія СК7, ІГХ з гематоксилином Майєра. В. Інтрануклеарна експресія естрогенових рецепторів (ER) окремими групами клітин, ІГХ з гематоксилином Майєра. Зб.: ×400.

Пухлинна тканина складалась із клітин з рясною цитоплазмою, що виглядало наче ядра розкидані на зрізі. Ядра помірно варіювали від середніх до

малих ($29,21 \pm 6,90$ мкм²). Поверхні ядерних мембран мали поодинокі інвагінації та вип'ячування, але здебільшого були рівні ($21,85 \pm 2,65$ мкм). Ядра мали форму ближче до овальної ($0,66 \pm 0,10$), але були також і зовсім неправильної форми. Пухлина, що демонструвала ці показники була метастазом низькодиференційованої дрібноклітинної АК молочної залози (МЗ), що продемонстрували маркери другої ІГХ панелі [СК 7 (+), ER (+), PGR (+), HER-2/neu (+), CA-125 (-), СК 20 (-)] (рис. 3.2 Б, В).

1.2. Підгрупа (7 із 10 спостережень): розміри ядер другої підгрупи варіювали в залежності від гістологічної будови від 32,42 до 48,18 мкм² за показником «площа» та від 23,28 до 27,69 мкм за показником «периметр», тобто були в 2,5-3 рази більше звичайних лімфоцитів і могли трактуватись як середньоклітинні, порівняно з підгрупою 1.1 (табл. 3.3). Показник «коефіцієнт круглості» мінявся в залежності від форми: від овальних до круглих клітин (від 0,69 до 0,82). Діагнози другого етапу ІГХ в цій підгрупі відзначились втратою ступеня диференціювання і здебільшого відповідали низькодиференційованим формам раку та інколи представляли собою лише окремі групи клітин серед фіброзної тканини (рис. 3.3).

Таблиця 3.3 – Показники морфометричного дослідження підгрупи 1.2 [Pan CK AE1/3 (+), Vimentin (-)] метастазів середньоклітинних карцином в лімфатичні вузли шиї програми ImageJ, мкм², мкм

Показники морфометрії неопластичних клітин	Площа (мкм ²)	Периметр (мкм)	Коефіцієнт круглості (параметр ImageJ)
Середнє значення (M)	45,23	26,34	0,76
Стандартне відхилення (SD)	6,04	4,54	0,07
Мінімальне значення (Min)	32,42	23,28	0,69
Максимальне значення (Max)	48,18	27,69	0,82

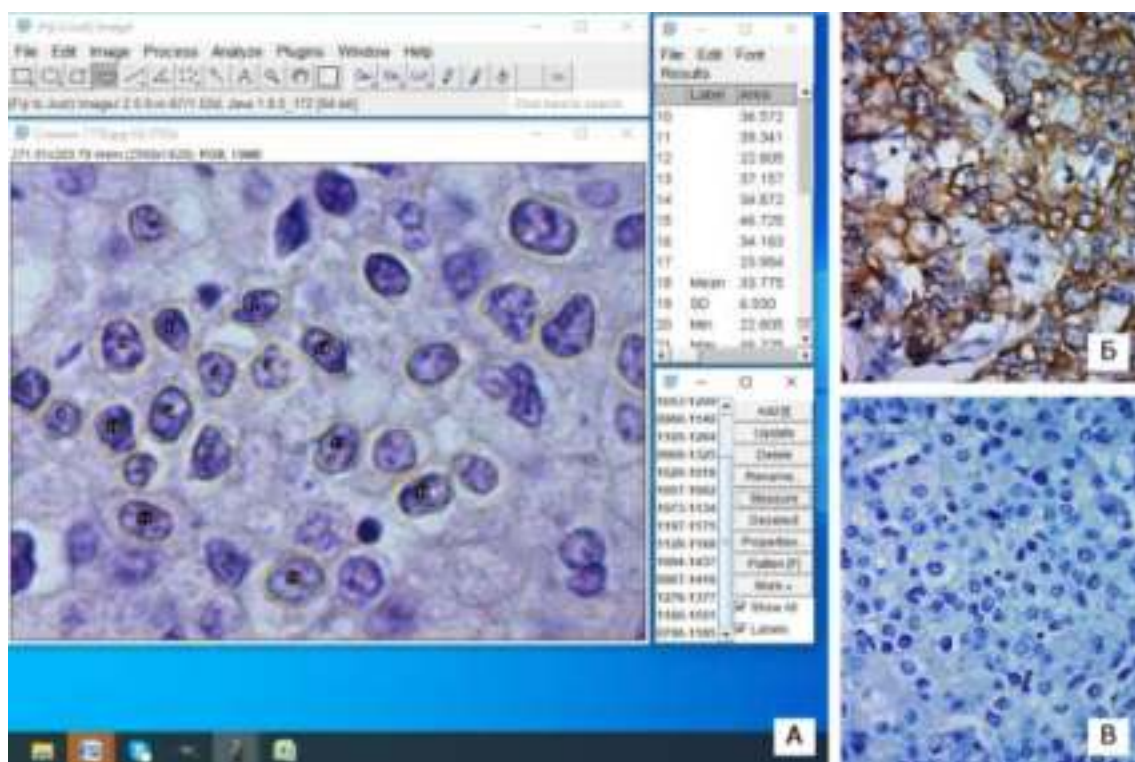


Рисунок 3.3 – А. Визначення МФМ параметрів ядер недиференційованого рака в програмі ImageJ, мікрофотографія із забарвленням гематоксиліном і еозином. Б. Позитивна експресія СК Pan AE1/AE3, ІГХ з гематоксиліном Майєра. В. Негативна експресія Vimentin, ІГХ з гематоксиліном Майєра.

36.: ×400.

В 3 випадках вдалося встановити напрямок аденогенного органонеспецифічного диференціювання – лише СК 7 (+) карциноми, але одна АК експресувала додатково [CA-125 (+) без ER / PGR] (вірогідно з яєчника), в 1 випадку – напрямок слабого плоскоклітинного диференціювання СК НМВ (+/-), 2 виявились недиференційованими раками (тільки Pan СК AE1/3 (+)) та 1 карциномою з клітин Меркеля – [СК 20 «dot like» (парануклеарно +) / Chromogranin A (+)], в якій клітини мали зовсім мало цитоплазми і були дуже щільно розташовані (рис. 3.4). В недиференційованих пухлинах з поліморфними ядрами коефіцієнт круглості був меншим (в середньому 0,78), ніж в карциномі з клітин Меркеля, яка відноситься до категорії дрібно-кругло-синьоклітинних пухлин і чий коефіцієнт круглості був, в середньому 0,89 (чим показник круглості є ближчим до одиниці – тим «круглішим» є ядра клітин).

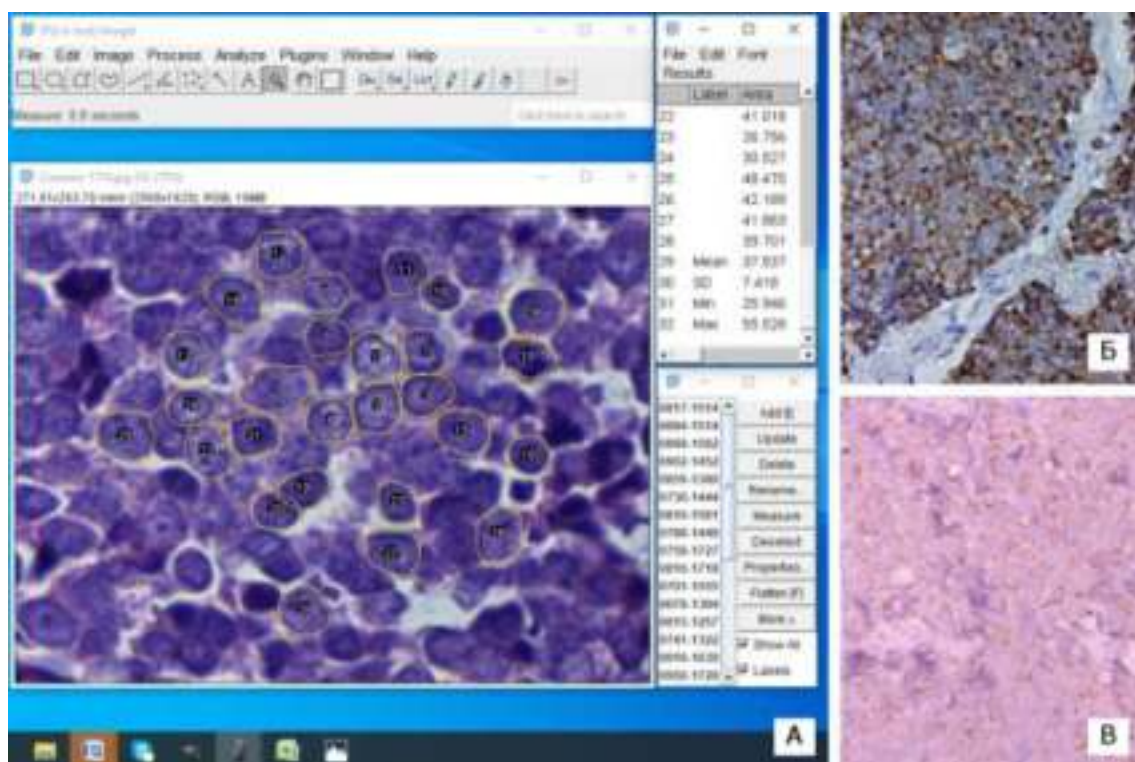


Рисунок 3.4 – А. Визначення МФМ параметрів ядер карциноми з клітин Меркеля в програмі ImageJ, мікрофотографія із забарвленням гематоксиліном і еозином. Б. Позитивна парануклеарна «dot like» експресія СК 20 (+), ІГХ з гематоксиліном Майєра. В. Слабка експресія Chromogranin A, ІГХ з гематоксиліном Майєра. Зб.: $\times 400$.

1.3. Третя підгрупа (2 із 10) імунофенотипу [Pan СК AE1/3 (+), Vimentin строго (-), CD45 (-), S100 (-)] із клітин з великими ядрами (в 6-9 разів більше звичайних лімфоцитів) була представлена 2 плоскоклітинними карциномами, які мали позитивні маркери [СК НМВ (+), p63 (+)] з другої панелі. Розміри ядер коливались від 170,88 до 73,93 μm^2 за площею та від 37,39 до 51,54 μm за периметром (табл. 3.4). Але лише в 1 випадку вдалося припустити походження метастазу ПР в ЛВШ з легенів у зв'язку з позитивністю на [TTF-1 (+), СК НМВ (+), p63 (+)] (рис. 3.5). Під час МФМ клітини ПР відрізнялись значним поліморфізмом ядер (стандартне відхилення за площею - 22,06 μm^2 , за периметром - 4,35 μm), також ядра містили чітко контуровані 1-3 ядерця та часто одну інвагінацію по середині. Рясна еозинофільна цитоплазма з вмістом кератину робила ядра ПР розміщеними на певній дистанції.

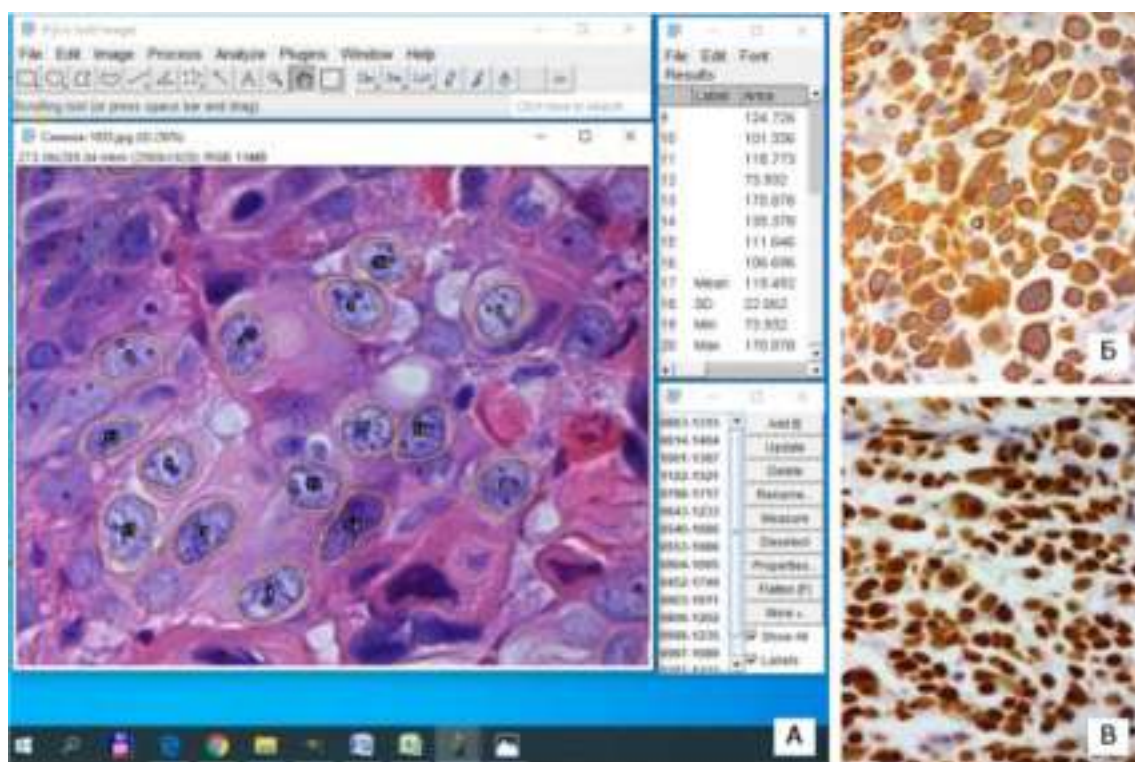


Рисунок 3.5 – А. Визначення МФМ параметрів ядер метастазу ПР легень в програмі ImageJ, мікрофотографія із забарвленням гематоксиліном і еозином. Б. Позитивна цитоплазматична експресія СК NMW, ІГХ з гематоксиліном Майєра. В. Інтрануклеарна позитивна експресія TTF-1 більшістю клітин на рівні 89 %, ІГХ з гематоксиліном Майєра. Зб.: $\times 400$.

Таблиця 3.4 – Показники морфометричного дослідження підгрупи 1.3 Pan CK AE1/3 (+), Vimentin (-) метастазів великоклітинної карциноми в лімфатичні вузли ший програми ImageJ, мкм^2 , мкм

Показники морфометрії неопластичних клітин	Площа (мкм^2)	Периметр (мкм)	Коефіцієнт круглості (параметр ImageJ)
Середнє значення (M)	119,49	42,52	0,70
Стандартне відхилення (SD)	22,06	4,35	0,13
Мінімальне значення (Min)	73,93	37,39	0,45
Максимальне значення (Max)	170,88	51,54	0,87

Діаграми на рисунках 3.6, 3.7 та 3.8 узагальнюють отримані дані за МФМ дослідженням «площі», «периметру», «коефіцієнту круглості» відповідно та демонструють відмінності підгруп від параметрів еталону МФМ.

Рисунки 3.6 та 3.7 об'єктивно демонструють розподіл різних за розміром епітеліальних метастазів на дрібно- середньо- та великоклітинні пухлини, що вписуються в діапазони:

- дійсно **дрібноклітинні** карциноми до 30 мкм^2 за площею та до 25 мкм за периметром (1-2 розмірів звичайних лімфоцитів ЛВШ);
- **середньоклітинні** карциноми з 30 до 50 мкм^2 за площею та з 25 до 35 мкм за периметром (2,5-3 розмірів звичайних лімфоцитів ЛВШ);
- **великоклітинні** карциноми, відповідно, більше 50 мкм^2 за площею та більше 35 мкм за периметром.

Треба додати, що з огляду на епітеліальну будову підгруп метастазів фенотипу [Pan CK AE1/3 (+), Vimentin строго (-), CD45 (-), S100 і/або HMB45 (-)], ядра пухлин всіх трьох підгруп були більш менш круглими і подібними до ЗЛ (рис. 3.8)

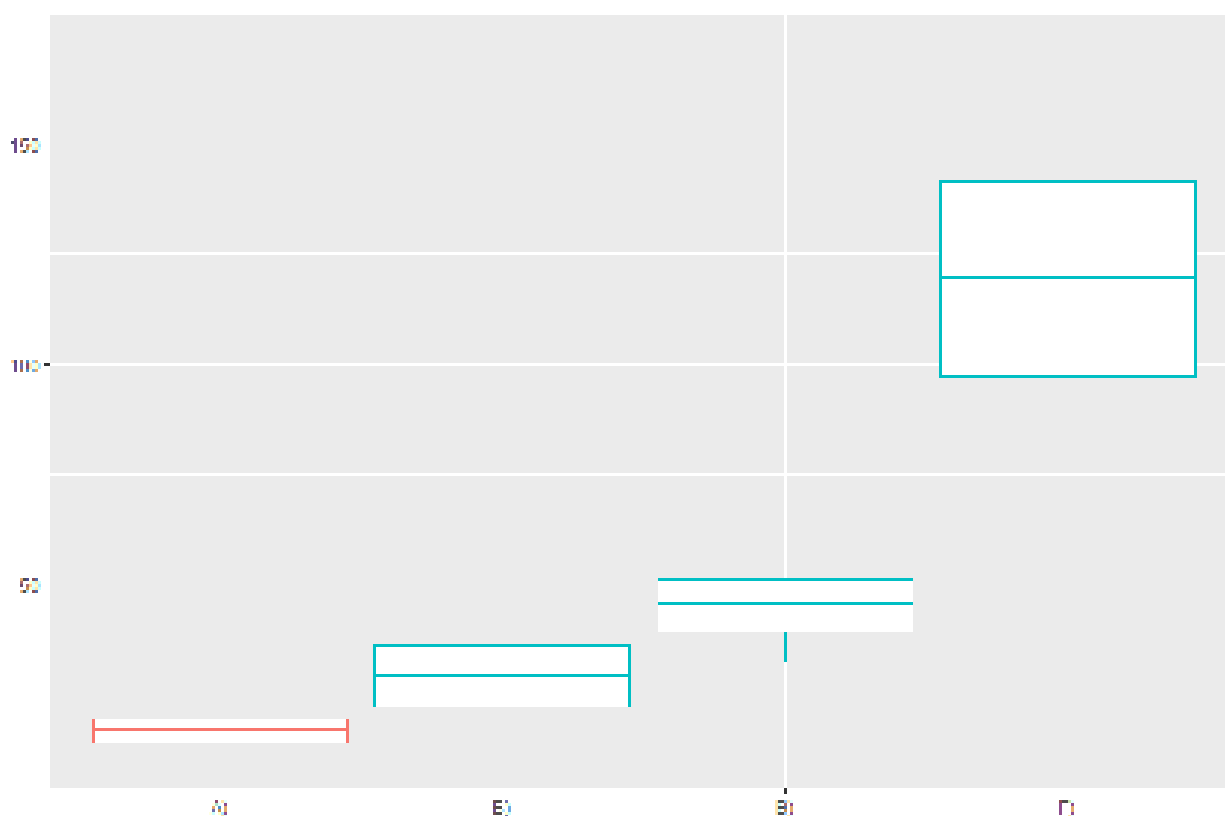


Рисунок 3.6 – Морфометричні показники площі фенотипу 1 [Pan CK AE1/3 (+), Vimentin строго (-), CD45 (-), S100 (-) і/або HMB45 (-)] пухлин в порівнянні з звичайними лімфоцитами лімфатичного вузла ший, мкм^2 . А – характеристики площі звичайних лімфоцитів (еталон), Б – підгрупа 1.1, В – підгрупа 1.2, Г – підгрупа 1.3.

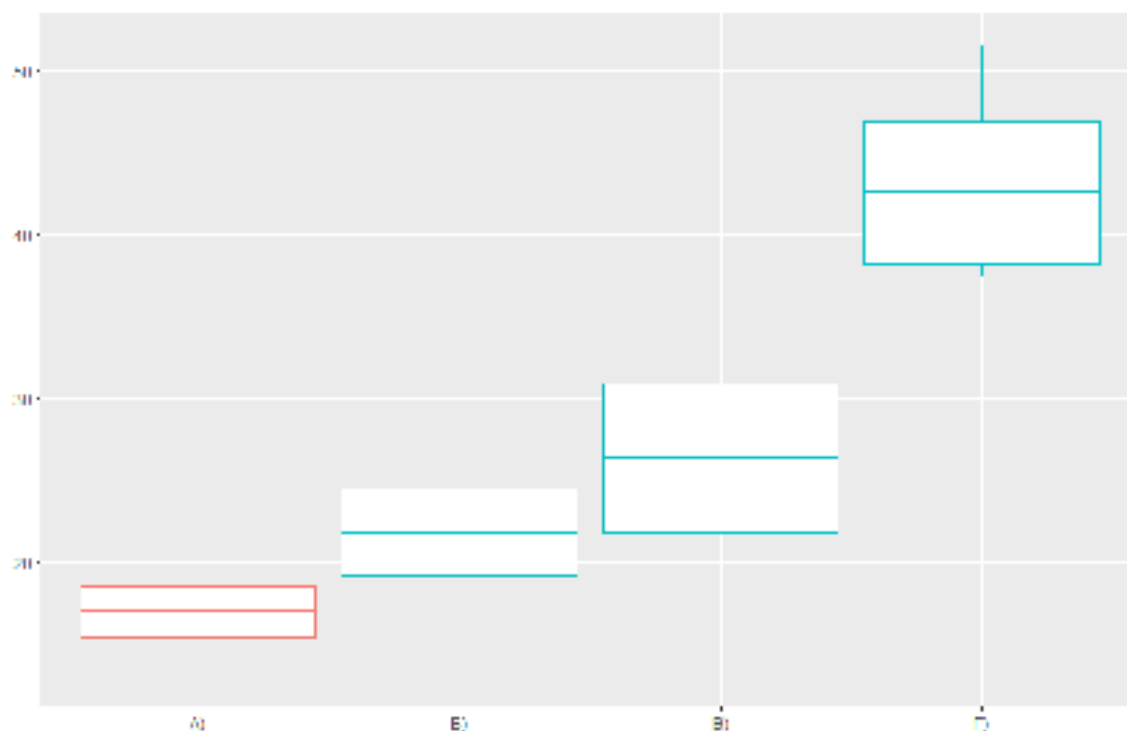


Рисунок 3.7 – Морфометричні показники периметру фенотипу 1 [Pan CK AE1/3 (+), Vimentin строго (-), CD45 (-), S100 (-) і/або HMB45 (-)] пухлин в порівнянні з ЗЛ ЛВШ, мкм. А – характеристики периметру звичайних лімфоцитів (еталон), Б – підгрупа 1.1, В – підгрупа 1.2, Г – підгрупа 1.3.

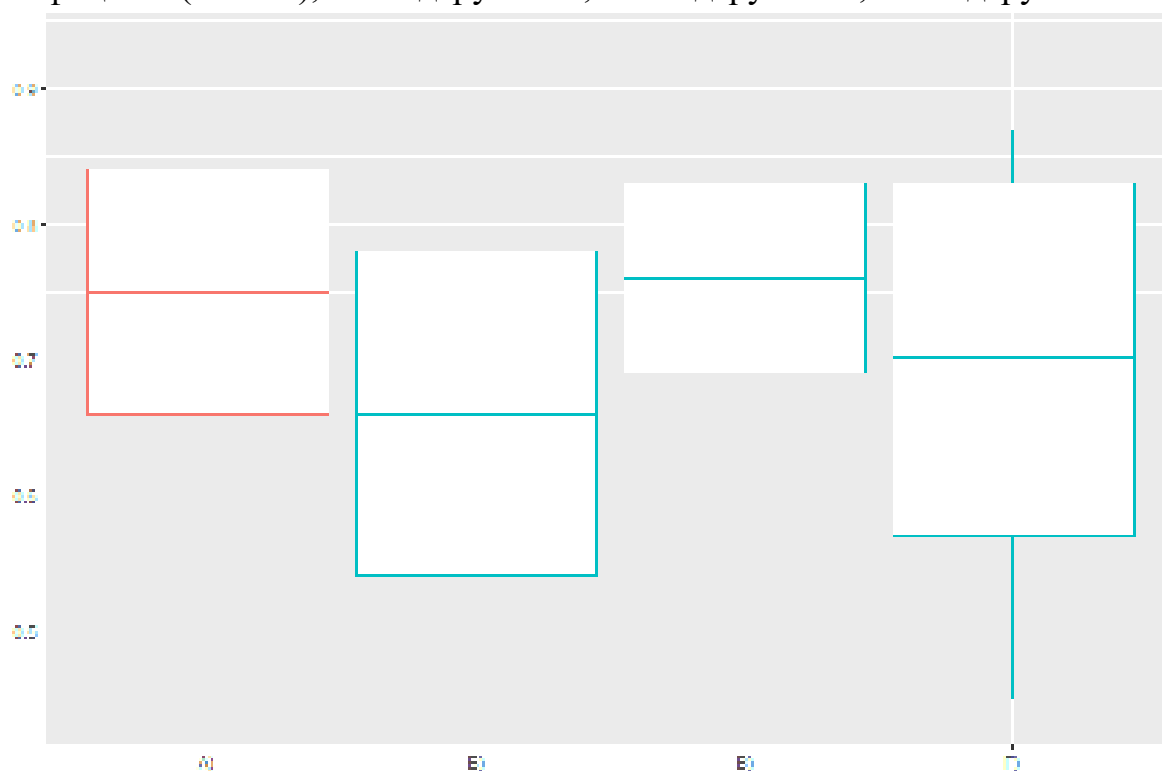


Рисунок 3.8 – Морфометричні показники коефіцієнта круглості фенотипу 1 [Pan CK AE1/3 (+), Vimentin строго (-), CD45 (-), S100 (-) і/або HMB45 (-)] пухлин в порівнянні з ЗЛ ЛВШ. А – характеристики коефіцієнту круглості звичайних лімфоцитів (еталон), Б – підгрупа 1.1, В – підгрупа 1.2, Г – підгрупа 1.3.

Фенотип [Pan CK AE1/3 – позитивний (+), Vimentin – позитивний (+) або частково позитивний (+/-), CD45 (-) – негативний, S100 і/або НМВ45 (-) – негативний] був представлений трьома різними підгрупами пухлинного процесу загальною кількістю 4 спостереження (28,57 %).

2.1. Перший представник такого фенотипу (1 із 4 спостережень, 25,0 %) відносився до категорії дрібноклітинні пухлини (1,5 рази більше лімфоцитів), а саме площа $27,74 \pm 8,37$ мкм² та периметр $21,59 \pm 5,75$ мкм, коефіцієнт круглості $0,63 \pm 0,09$, дрібні клітини із скудною еозинофільною цитоплазмою, що після другої ланки ІГХ відповідало метастазу папілярного раку щитоподібної залози з типовими ядрами, поділеними неповною перетинкою навпіл (табл. 3.5).

Таблиця 3.5 – Показники морфометричного дослідження підгрупи 2.1 [Pan CK AE1/3 (+), Vimentin (+)] метастазу папілярного раку щитоподібної залози в лімфатичному вузлі шийї програми ImageJ, мкм², мкм

Показники морфометрії неопластичних клітин	Площа (мкм ²)	Периметр (мкм)	Коефіцієнт круглості (параметр ImageJ)
Середнє значення (M)	27,74	21,59	0,63
Стандартне відхилення (SD)	8,37	3,75	0,09
Мінімальне значення (Min)	21,54	19,87	0,51
Максимальне значення (Max)	28,76	23,09	0,93

2.2. Друга підгрупа (1 із 4 спостережень, 25,0 %) була представлена [CK Pan AE1/3 (+), Vimentin – частково (+/-)] світлими поліморфними клітинами великих розмірів з оптично пустою цитоплазмою і чіткими межами, що дозволило оцінити їх розміри також (площа $150,89 \pm 70,25$ мкм² та периметр $49,96 \pm 11,32$ мкм, коефіцієнт круглості $0,66 \pm 0,42$), разом із ядрами. МФМ дослідження виявило поліморфні ядра ближчих до середніх розмірів (площа $34,21 \pm 9,14$ мкм² та периметр $24,48 \pm 3,85$ мкм, коефіцієнт круглості $0,61 \pm 0,17$), що були зміщені на периферію, інколи витягнуті вздовж клітинної оболонки (рис. 3.9).

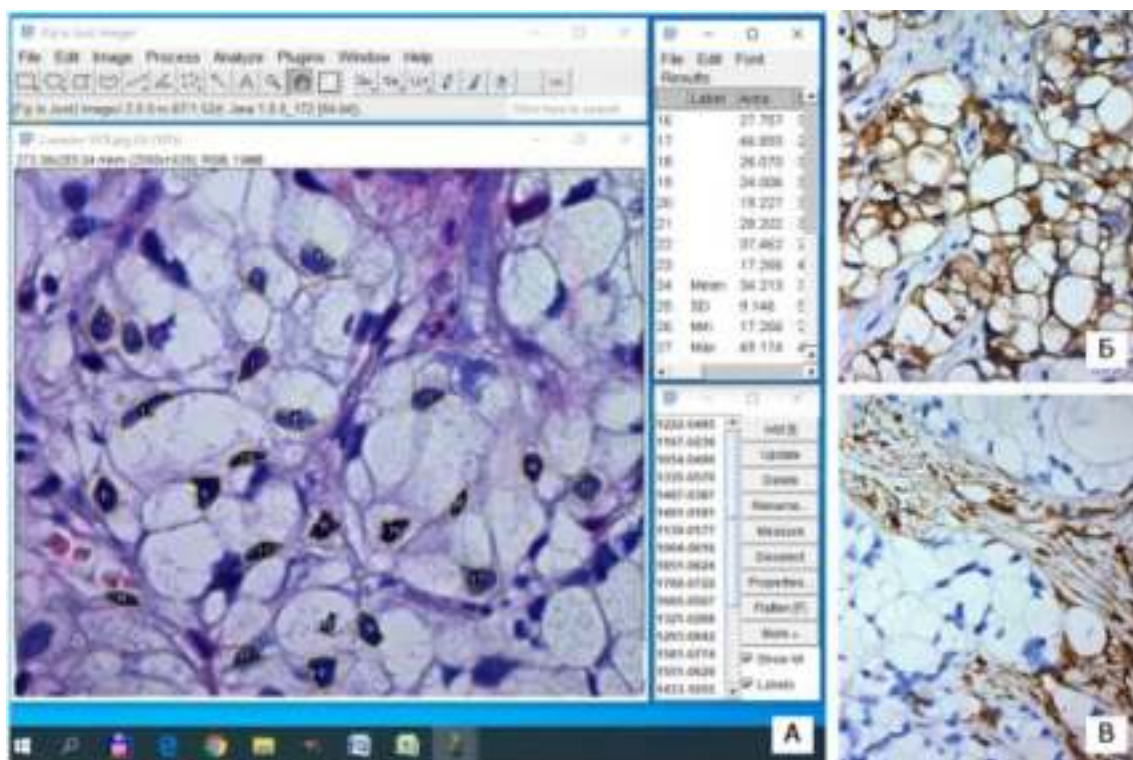


Рисунок 3.9 – А. Визначення МФМ параметрів ядер метастазу світло-клітинного нирково-клітинного раку в програмі ImageJ, мікрофотографія із забарвленням гематоксилином і еозином. Б. Позитивна цитоплазматична експресія СК Pan AE1/3, ІГХ з гематоксилином Майєра. В. Експресія Vimentin частиною клітин, ІГХ з гематоксилином Майєра. Зб.: $\times 400$.

Діагноз після другої панелі ІГХ було підтверджено як метастаз [СК Pan AE1/3 (+), Vimentin (+/-), СК 7(-), CD10 (+), PAX 8 (+)] світлоклітинної карциноми вірогідно з нирок (рис. 3.9 Б, В). Треба сказати, що у жінок метастази світло-клітинних карцином потребують ретельної диференційної діагностики між первинними локалізаціями в нирках та репродуктивних органах (яєчники, ендометрій, шийка матки). Незважаючи на те, що СК 7, CD10 та PAX-8 можуть експресуватись у світло-клітинних карциномах всіх зазначених локалізацій, для репродуктивних органів частіше характерно [СК 7(+), CD10 (-), PAX-8 (-)], а для нирок навпаки [СК 7(-), CD10 (+), PAX-8 (+)], що мало місце в нашому спостереженні.

2.3. Наступні варіанти [Pan СК AE1/3 (+), Vimentin (+), CD45 (-), S100 і/або НМВ45 (-)] фенотипу (2 із 4 спостережень, 50,0 %) мали в 2,5-3 рази більші ніж лімфоцити круглі ядра (площа $41,14 \pm 5,45$ μm^2 та периметр

25,01±2,35 мкм, коефіцієнт круглості 0,75±0,08), тобто відносились до категорії середньоклітинних карцином і відповідали метастазам недиференційованого раку аденогенного походження [Pan CK AE1/3 (+), Vimentin (+/-), CK 7 (+), CK 20 (-), CK HMW (-)], подібно до 1.2. підгрупи Vimentin (-) недиференційованих карцином (табл. 3.6).

Таблиця 3.6 – Показники морфометричного дослідження підгрупи 2.3 [Pan CK AE1/3 (+), Vimentin (+)] метастазів недиференційованого раку в лімфатичних вузлах шиї програми ImageJ, мкм², мкм

Показники морфометрії неопластичних клітин	Площа (мкм ²)	Периметр (мкм)	Коефіцієнт круглості (параметр ImageJ)
Середнє значення (M)	41,14	25,01	0,75
Стандартне відхилення (SD)	5,45	2,35	0,08
Мінімальне значення (Min)	36,41	22,21	0,61
Максимальне значення (Max)	44,16	28,69	0,79

Аналізуючи процеси метастазування в ЛВШ для верифікованих пухлин з різних літературних джерел, ми сподівались зустріти більшість РНПЛ з плоскоклітинним варіантом диференціювання серед метастатичних карцином. Але, як вже описано, після другої ІГХ панелі з метастазів категорії 2 (попередній РНПЛ) ми за період серпень 2016 р. - липень 2017 р. отримали 21,43 % плоскоклітинних карцином (3 з 14 Pan CK AE1/3 (+) метастазів). Із них лише в одному випадку органо-специфічна локалізація була встановлено з певною вірогідністю (в легенях [TTF-1 (+), CK HMW (+), p63 (+)]), інші вірогідно походили з ділянок голови та шиї.

Діаграми на рисунках 3.10, 3.11 та 3.12 узагальнюють отримані дані за МФМ дослідженням «площі», «периметру», «коефіцієнту круглості» підгруп 2.1, 2.2, 2.3. Дві останні підгрупи попадають в категорію середньоклітинних карцином (площа від 30 до 50 мкм² та периметр від 25 до 35 мкм), але з коефіцієнтом круглості трохи нижчим за ЗЛ, що говорить про більш витягнуту «мезенхімо-подібну» форму [Pan CK AE1/3 (+), Vimentin (+)] клітин карцином цього фенотипу (рис. 3.12).

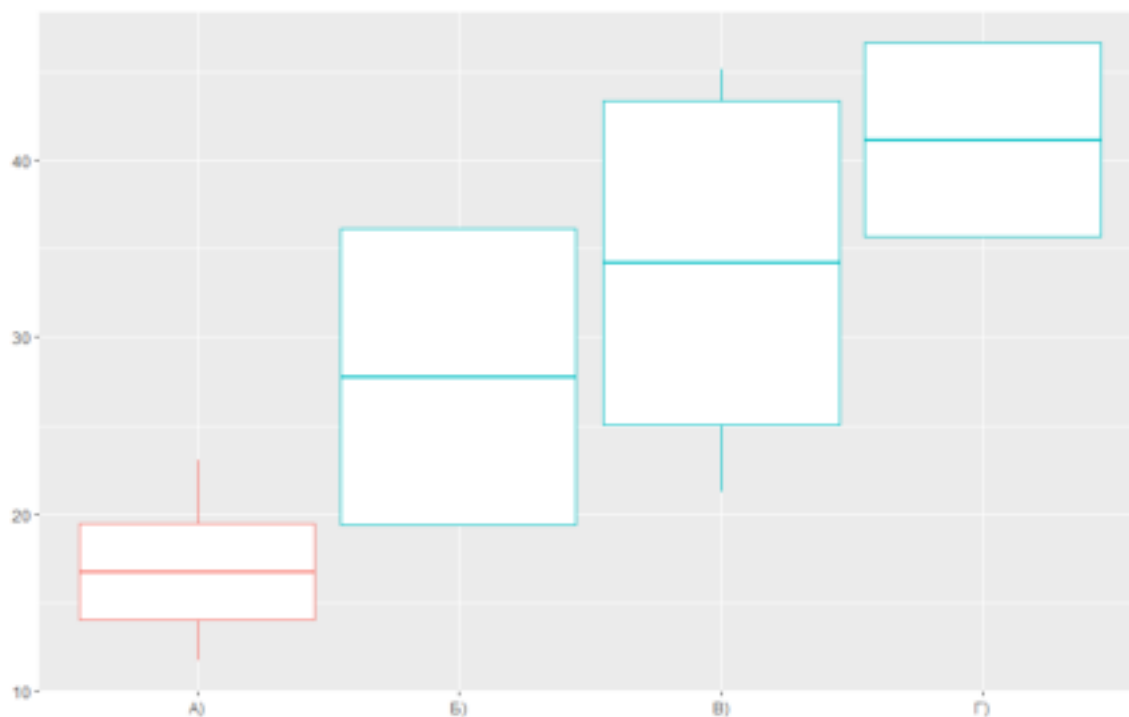


Рисунок 3.10 – Морфометричні показники площі фенотипу 2 [Pan CK AE1/3 (+), Vimentin частково позитивні (+/-), CD45 (-), S100 і/або HMB45 (-)] пухлин в порівнянні з звичайними лімфоцитами, мкм². А – характеристики площі звичайних лімфоцитів (еталон), Б – підгрупа 2.1, В – підгрупа 2.2, Г – підгрупа 2.3.

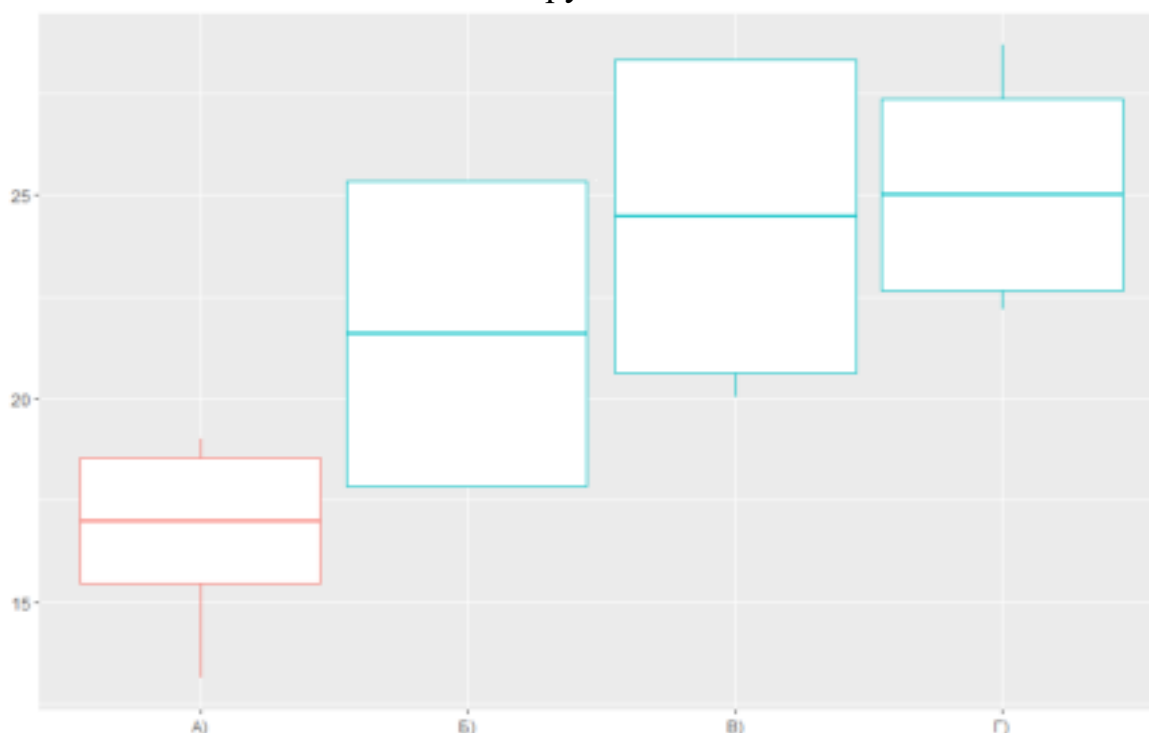


Рисунок 3.11 – Морфометричні показники периметру фенотипу 2 [Pan CK AE1/3 (+), Vimentin частково позитивні (+/-), CD45 (-), S100 і/або HMB45 (-)] пухлин в порівнянні з звичайними лімфоцитами, мкм. А – характеристики периметру звичайних лімфоцитів (еталон), Б – підгрупа 2.1, В – підгрупа 2.2, Г – підгрупа 2.3.

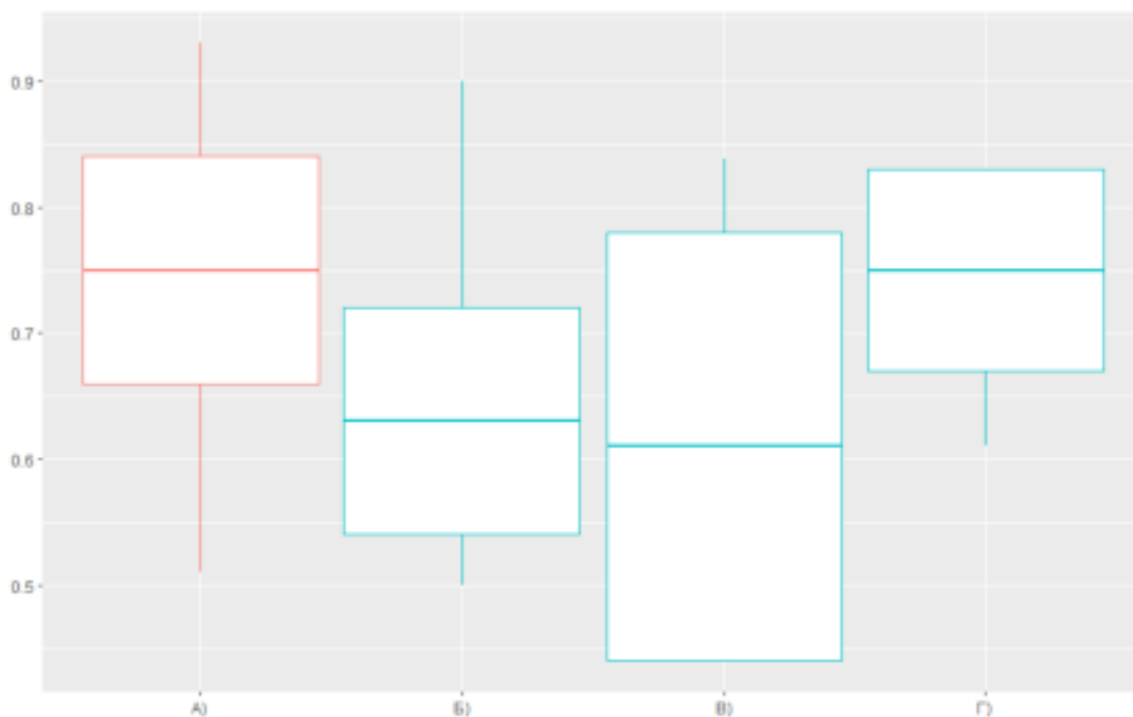


Рисунок 3.12 – Морфометричні показники коефіцієнту круглості фенотипу 2 [Pan CK AE1/3 (+), Vimentin частково позитивні (+/-), CD45 (-), S100 i/або HMB45 (-)] пухлин в порівнянні з звичайними лімфоцитами. А – характеристики коефіцієнту круглості звичайних лімфоцитів (еталон), Б – підгрупа 2.1, В – підгрупа 2.2, Г – підгрупа 2.3.

3.2 [Pan CK AE1/3 негативні (-), Vimentin позитивні (+)] метастази пухлин невідомої первинної локалізації в лімфатичні вузли ший: варіанти імунотипів, морфометричне дослідження

Три виявлених Pan CK AE1/3 - негативних (-) фенотипи завдяки маркерам первинної панелі поділились на гемолімфоцитарні пухлини (23 із 41 (56,10 %) [Vimentin (+/-), CD45 (+), S100 i/або HMB45 (-)]); меланоми (2 із 41 (4,88 %) [Vimentin (+), CD45 (-), S100 i/або HMB45 (+)]) та мезенхімальні пухлини (2 із 41 (4,88 %) [Vimentin (+), CD45 (-), S100 i/або HMB45 (-)]), де, як видно, маркер мезенхімальних проміжних філаментів Vimentin був завжди позитивним та неспецифічним.

Дослідження морфології та параметрів ядер фенотипу гемолімфоцитарних пухлин (n=23) [Pan CK AE1/3 (-) – негативних, Vimentin (+/-) – частко-

во позитивних, CD45 (+) – позитивних, S100 і/або НМВ45 (-)] – негативних злоякісних пухлин дозволило розподілити їх на три підгрупи.

1.1 Перша підгрупа [**Vimentin (+/-), CD45 (+)**] метастазів (6 із 23 спостережень, 26,08 %) продемонструвала ядра клітин на рівні звичайних лімфоцитів ЛВШ. Клітини були мономорфні, круглі (коефіцієнт круглості від 0,80 до 0,99), відзначались скудною цитоплазмою, дисоційовані та без десмопластичної реакції строми. Така пухлинна тканина відповідала фенотипам різних лімфопрولیферативних процесів: лімфома із малих лімфоцитів / хронічний лімфолейкоз, лімфома з клітин маргінальної зони, В-клітинна лімфома, збагачена Т-лімфоцитами та відповідала категорії дрібноклітинних пухлин (табл. 3.7).

Таблиця 3.7 – Морфометричні показники 1.1 підгрупи [Pan СК AE1/3 (-), Vimentin (+/-), CD45 (+), S100 і/або НМВ45 (-)] фенотипу лімфопрولیферативних ушкоджень лімфатичного вузла ший, мкм², мкм

Показники морфометрії неопластичних клітин	Площа (мкм ²)	Периметр (мкм)	Коефіцієнт «круглості» (параметр ImageJ)
Середнє значення	14,90	15,23	0,89
Стандартне відхилення	1,26	0,95	0,05
Мінімальне значення	13,04	13,61	0,80
Максимальне значення	17,39	17,97	0,99

1.2 Друга підгрупа [**Vimentin (+/-), CD45 (+)**] метастазів (7 із 23 спостережень, 30,43 %) мала середні значення МФМ показників ядер, що в 2,5 рази перевищували розміри ЗЛ ЛВШ. Тканина непластичного процесу містила поліморфноядерні клітини, де більша частина мала подібні розміри (35,91±6,91 мкм² і 23,38±1,90 мкм), а невелика частина (не більше 5 % від всіх пухлинних клітин) складалась з достатньо круглих (0,79±0,10) великих анапластичних клітин (площею до 52,57 мкм² та периметром до 27,64 мкм) (табл. 3.8, рис. 3.13).

Діагнози, що відповідали лімфопрولیферативним захворюванням з клітинами таких розмірів виявилися дифузною великоклітинною В-клітиною

лімфомою, фолікулярною лімфомою, хворобою Кастлемана, неспецифірованою периферійною Т-клітинною лімфомою.

Таблиця 3.8 – Морфометричні показники підгрупи 1.2 [Pan СК AE1/3 (-), Vimentin (+/-), CD45 (+), S100 (-)] фенотипу лімфопроліферативних захворювань лімфатичного вузла шийї, мкм², мкм

Показники морфометрії неопластичних клітин	Площа (мкм ²)	Периметр (мкм)	Коефіцієнт «круглості» (параметр ImageJ)
Середнє значення	35,91	23,38	0,79
Стандартне відхилення	6,91	1,90	0,09
Мінімальне значення	24,61	20,39	0,58
Максимальне значення	52,57	27,64	0,98

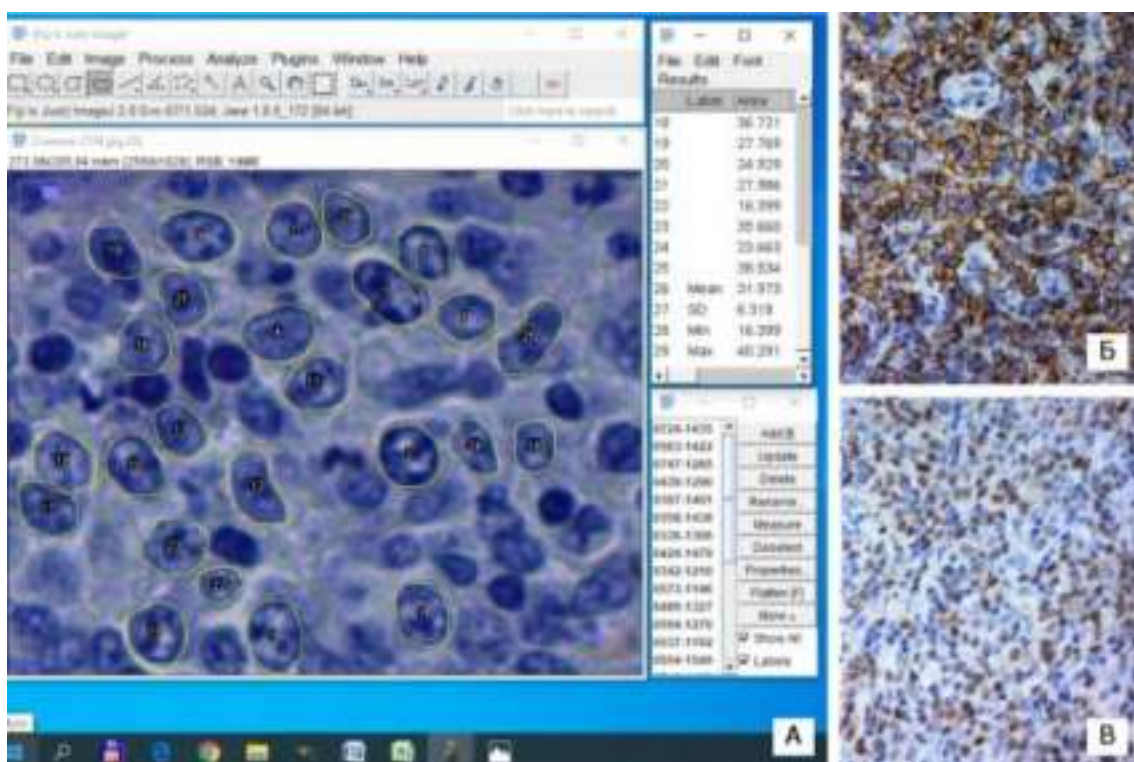


Рисунок 3.13 – А. Визначення МФМ параметрів ядер великоклітинної В-клітинної лімфони в програмі ImageJ, мікрофотографія із забарвленням гематоксилином і еозином. Б. Позитивна мембранна експресія CD20 В-лімфоцитів, ІГХ з гематоксилином Майєра. В. Інтрануклеарна експресія Mm1 (multiple myeloma oncogene 1) більшості клітин (до 70 %), ІГХ з гематоксилином Майєра. Зб.: ×400.

1.3 Третя підгрупа [**Vimentin (+/-)**, **CD45 (+)**] метастазів (10 із 23 спостережень, 43,48 %), середні розміри пухлинних клітин якої в 3-4 рази пере-

вищували розміри звичайних лімфоцитів ЛВШ. Цікаво, що ця найбільша підгрупа 1.3 була представлена двокомпонентною дисоційованою лімфоїдною пухлинною тканиною з великими анапластичними ядрами CD30 (+) діагностичних клітин різної форми площею до $107,63 \text{ мкм}^2$ (в 4-6 разів більше звичайних лімфоцитів) та CD20 (+) клітинами оточення, ядра яких лише в 1,5 рази крупніші від звичайних лімфоцитів ЛВШ (до $26,84 \text{ мкм}^2$), обидва компонента клітин помірної круглості ($0,73 \pm 0,11$). Таким параметрам відповідали класичні варіанти лімфоми Ходжкіна. Середні розміри площі та периметру ядер спостереження збільшувались при підвищенні кількості діагностичних клітин типу «pop corn» (рис. 3.14, табл. 3.9).

Діаграми на рисунках 3.15, 3.16 та 3.17 узагальнюють отримані дані за МФМ дослідженням «площі», «периметру», «коефіцієнту круглості» підгруп 1.1, 1.2, 1.3 Vimentin (+/-), CD45 (+) лімфопроліферативних ушкоджень ЛВШ.

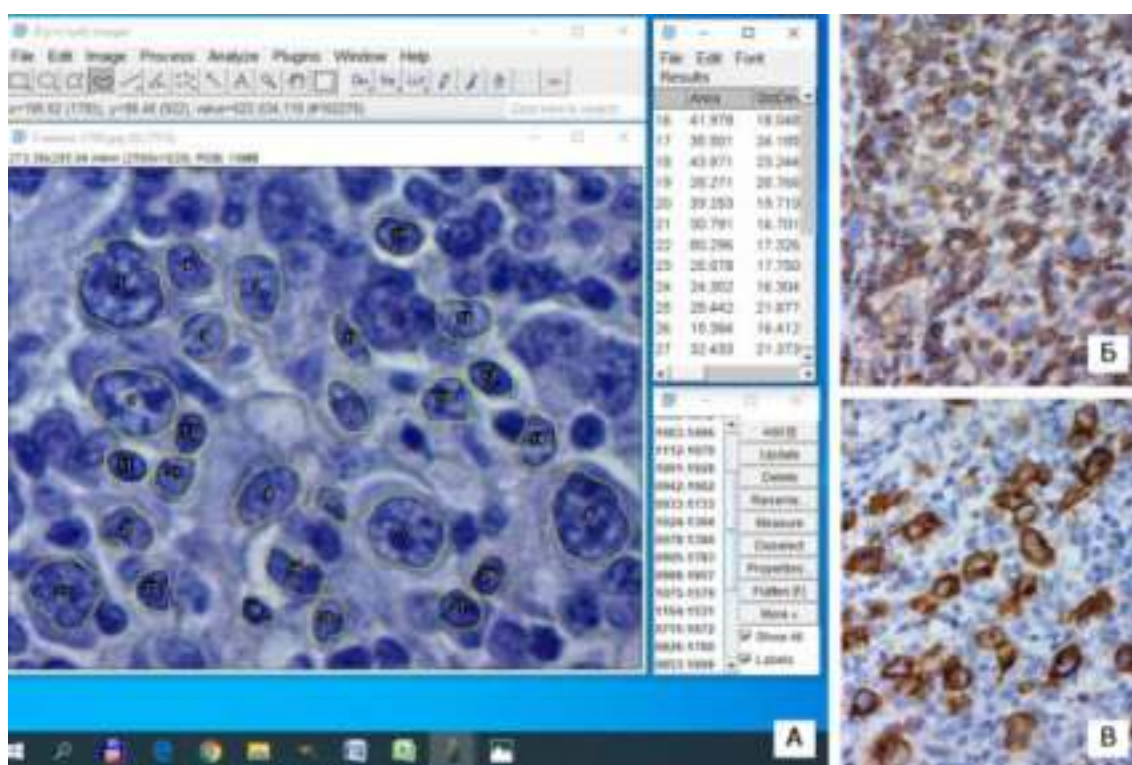


Рисунок 3.14 – А. Визначення МФМ параметрів ядер класичної форми лімфоми Ходжкіна змішано-клітинний варіант в програмі ImageJ, мікрофотографія із забарвленням гематоксиліном і еозином. Б. Позитивна мембранна експресія CD20 В-лімфоцитів, ІГХ з гематоксиліном Майєра. В. Експресія CD30 в діагностичних клітинах Ходжкіна, ІГХ з гематоксиліном Майєра. Зб.: $\times 400$.

Таблиця 3.9 – Морфометричні показники 1.3 підгрупи [Pan CK AE1/3 (-), Vimentin (+/-), CD45 (+), S100 і/або HMB45 (-)] фенотипу лімфопроліферативних ушкоджень лімфатичного вузла шиї, мкм², мкм

Показники морфометрії неопластичних клітин	Площа (мкм ²)	Периметр (мкм)	Коефіцієнт «круглості» (параметр ImageJ)
Середнє значення	55,39	26,06	0,73
Стандартне відхилення	20,64	2,8	0,11
Мінімальне значення	26,84	22,03	0,55
Максимальне значення	107,63	34,15	0,92

Рисунок 3.15 є дуже показовим для об'єктивного описання морфологічних особливостей різних лімфом / лейкозів. Група 1.1 (стовпчик Б) дуже мноморфна (стандартне відхилення невелике) та дійсно дрібноклітинна, в порівнянні з еталоном, навпаки група 1.3 (стовпчик Г) – двохкомпонентна за розмірами клітин тканина демонструє велике стандартне відхилення та широкі межі середніх значень.

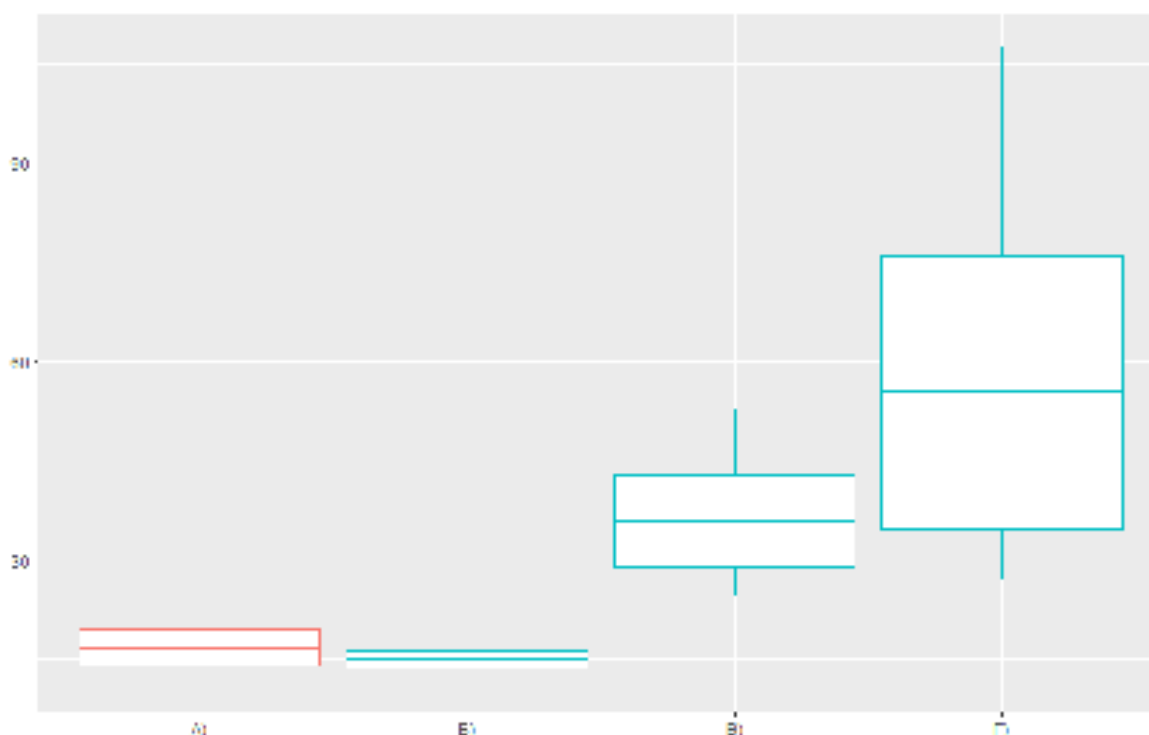


Рисунок 3.15 – Морфометричні показники площі фенотипу 1 [Pan CK AE1/3 (-), Vimentin частково позитивні (+/-), CD45 (+), S100 і/або HMB45 (-)] лімфопроліферативних ушкоджень ЛВШ в порівнянні з звичайними лімфоцитами, мкм². А – характеристики площі звичайних лімфоцитів (еталон), Б – підгрупа 1.1, В – підгрупа 1.2, Г – підгрупа 1.3.

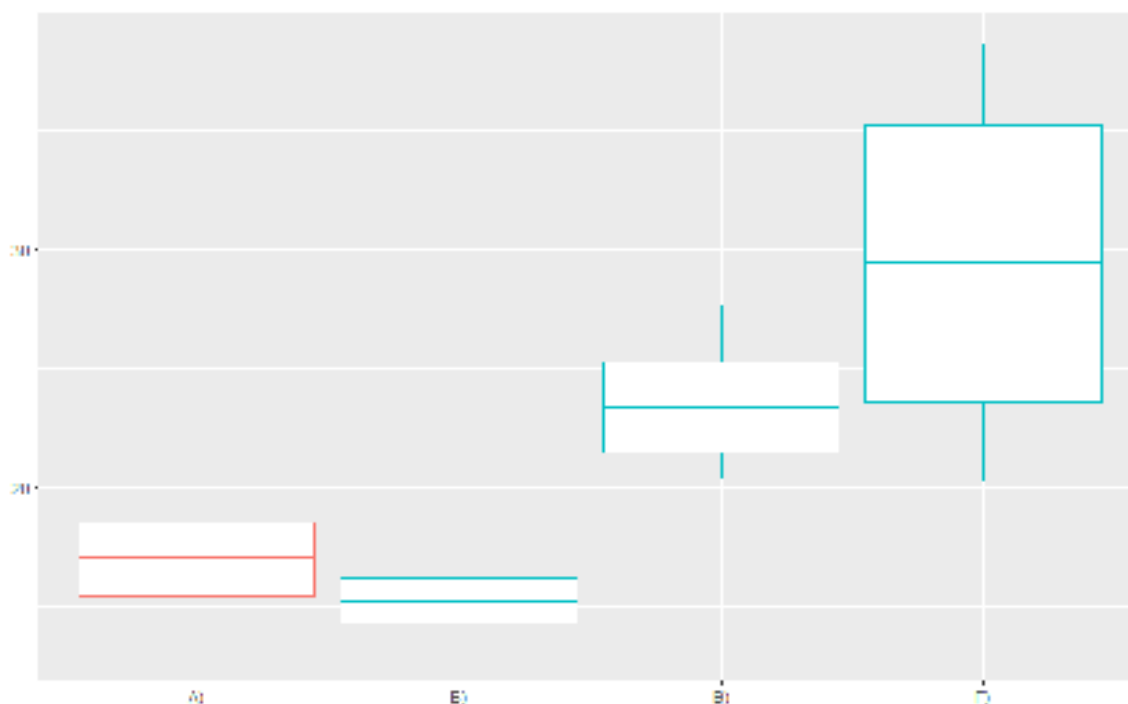


Рисунок 3.16 – Морфометричні показники периметру фенотипу 1 [Pan CK AE1/3 (-), Vimentin частково позитивні (+/-), CD45 (+), S100 і/або HMB45 (-)] лімфопроліферативних ушкоджень ЛВШ в порівнянні з звичайними лімфоцитами, мкм. А – характеристики периметру звичайних лімфоцитів (еталон), Б – підгрупа 1.1, В – підгрупа 1.2, Г – підгрупа 1.3.

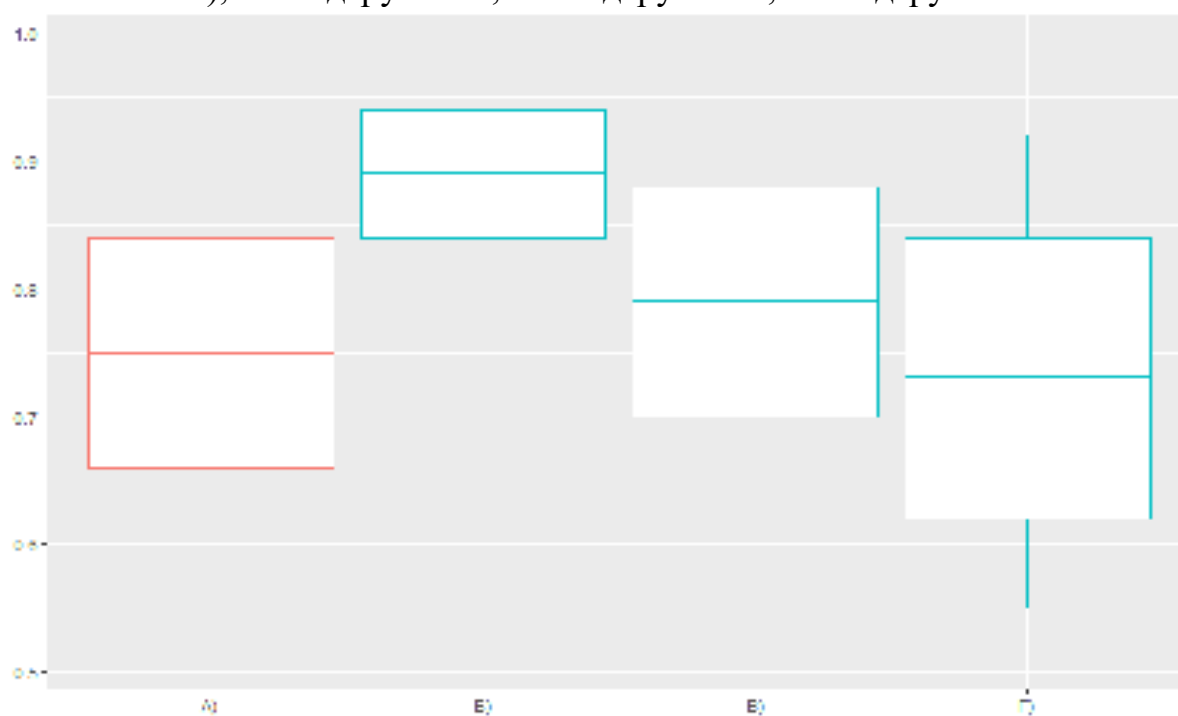


Рисунок 3.17 – Морфометричні показники коефіцієнту круглості фенотипу 1 [Pan CK AE1/3 (-), Vimentin (+/-), CD45 (+), S100 і/або HMB45 (-)] лімфопроліферативних ушкоджень ЛВШ в порівнянні з ЗЛ. А – характеристики коефіцієнту круглості звичайних лімфоцитів (еталон), Б – підгрупа 1.1, В – підгрупа 1.2, Г – підгрупа 1.3.

Рисунок 3.16 показує картину за периметром подібну до рисунку 3.15, але на рисунку 3.17 коефіцієнт круглості знижується від групи 1.1 до 1.3, отримали цікавий результат – чим лімфома дрібніша, тим вона кругліша.

Другий фенотип [Pan CK AE1/3 – негативних (-), **Vimentin** – строго позитивних (+), CD45 (-) – негативних, **S100 i/або НМВ45 (+)**] – позитивних неопластичних уражень (2 із 41 (4,88 %)) різко відрізнявся за морфологією, порівняно з попередніми групами. Ядра клітин цих випадків мали високий коефіцієнт круглості ($0,80 \pm 0,13$), середні розміри (площа – $45,91 \pm 9,43$ мкм² та периметр – $26,06 \pm 2,8$ мкм), рясну еозинофільну цитоплазму та включали 1-2 великих яскраво еозинофільних ядерця. Клітини метастатичного ураження ЛВШ підгрупи 2 демонстрували як ділянки дисоціації клітин, так і солідний тип будови тканини, й відповідали діагнозу безпігментна меланома (рис. 3.18 А, табл. 3.10).

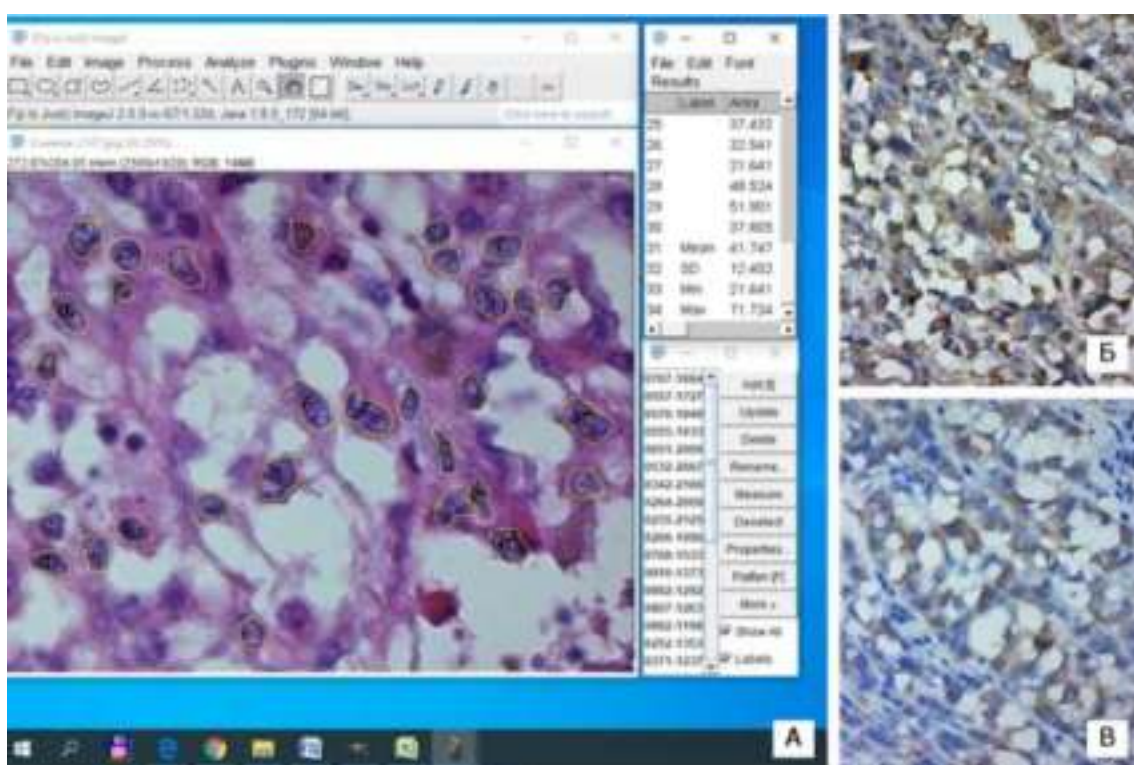


Рисунок 3.18 – А. Визначення МФМ параметрів ядер метастазу меланоми в програмі ImageJ, мікрофотографія із забарвленням гематоксиліном і еозином. Б. Позитивна змішана ядерно-цитоплазматична експресія протеїну S100, ІГХ з гематоксиліном Майєра. В. Позитивна експресія маркера премеланосом НМВ45, ІГХ з гематоксиліном Майєра. Зб.: $\times 400$.

Таблиця 3.10 – Морфометричні показники фенотипу [Pan CK AE1/3 (-), Vimentin (+), CD45 (-), S100 і/або HMB45 (+)] безпігментної меланоми лімфатичного вузла шії, мкм², мкм

Показники морфометрії неопластичних клітин	Площа (мкм ²)	Периметр (мкм)	Коефіцієнт «круглості» (параметр ImageJ)
Середнє значення	45,91	26,06	0,80
Стандартне відхилення	9,43	2,80	0,13
Мінімальне значення	34,17	23,82	0,75
Максимальне значення	53,54	28,21	0,93

В літературі описані випадки часткової експресії в меланомах α -актину гладеньких м'язів, кальдесмону, цитокератинів простих епітеліїв, але в нашому дослідженні такі випадки зафіксовані не були. У широкій практиці найбільше використання для імунотипуювання меланом, на відміну від карцином та сарком, найшли антитіла до ізоформи α білку S100 (первинний скринінг пухлин нейроектодермального походження) (рис. 3.18 Б) та премеланосом HMB-45 (маркер меланоцитарного диференціювання) (рис. 3.18 В). Таким чином, найбільш поширений фенотип меланоми відповідає [Pan CK AE1/3 (-), CD45 (-), Vimentin (+), **S100 (+) та HMB45 (+)**], що передбачає використання цих маркерів разом.

Достатньо складним розділом онкоморфології є диференційна діагностика метастазів меланоми, особливо безпігментної, в лімфатичні вузли з низькодиференційованими карциномами, саркомами, лімфопрولیферативними захворюваннями. Звичайно більшість віддалених метастазів від меланоми клінічно передбачувані та виявляються під час диспансерних відвідувань протягом декількох років після видалення первинної пухлини. До того ж метастаз пігментної меланоми, навіть у складних діагностичних випадках, таких як веретеноподібна або десмопластична меланома, може визначитися завдяки наявності меланіну.

Крім лімфатичних вузлів, найбільш поширеним місцем для метастазування меланоми є шкіра. Вісцеральні метастази частіше розташовані в леге-

нях, печінці, центральній нервовій системі і кістках. Все одно пацієнти, у яких метастази лімфатичних вузлів стали першими клінічними проявами онкозахворювання, можливо через редукцію первинного ураження шкіри, завжди потребують проведення додаткового ІГХ дослідження для уникнення діагностичних помилок. Найскладніші питання викликає безпігментна меланома, яка має безліч різних гістологічних варіантів будови (плеоморфні, перснеподібні, дрібноклітинні – як варіант ДКСК).

Діаграми на рисунках 3.19, 3.20 та 3.21 демонструють відмінність МФМ параметрів «площі», «периметру», «коефіцієнту круглості» фенотипу [Pan CK AE1/3 (-), Vimentin (+/-), CD45 (-), S100 i/або HMB45 (+)] безпігментної меланоми від звичайних лімфоцитів. Характеристики відповідають середньоклітинній пухлині з круглими ядрами, що дуже подібні до категорії дрібно-кругло-синьо-клітинних пухлин, наприклад, карциномі з клітин Меркеля або альвеолярній рабдоміосаркомі.

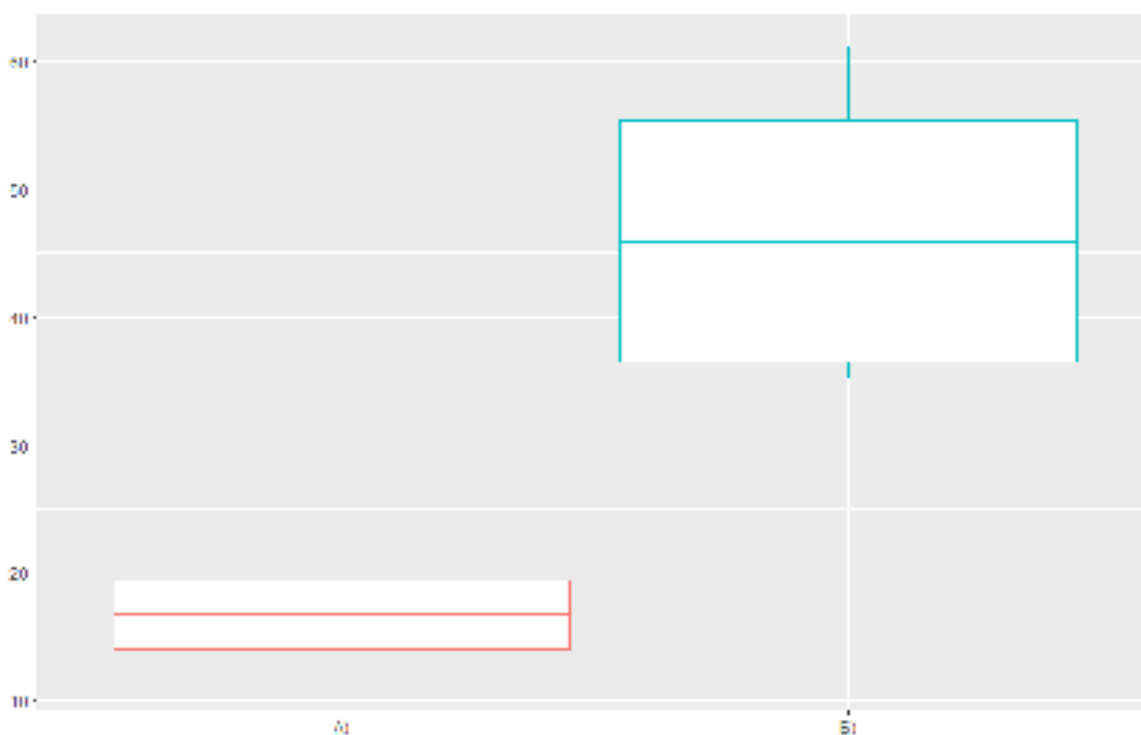


Рисунок 3.19 – Морфометричні показники площі фенотипу [Pan CK AE1/3 (-), Vimentin (+/-), CD45 (-), S100 i/або HMB45 (+)] безпігментної меланоми в порівнянні з звичайними лімфоцитами, μm^2 . А – характеристики площі звичайних лімфоцитів (еталон), Б – меланома.

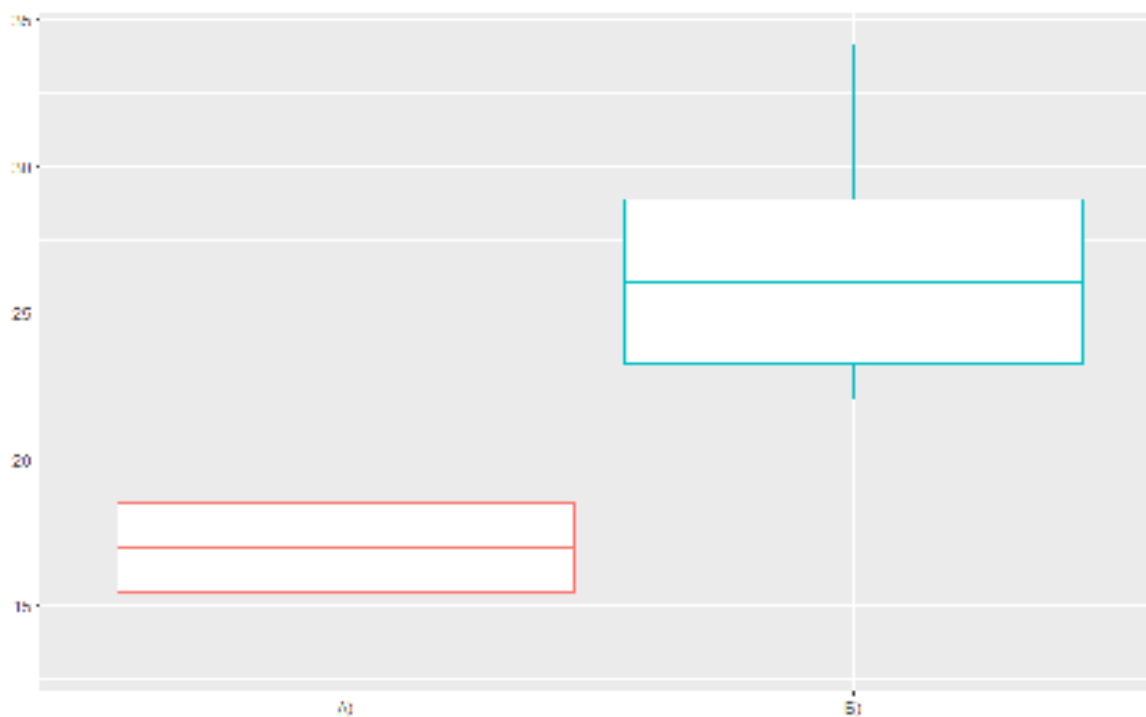


Рисунок 3.20 – Морфометричні показники периметру фенотипу [Pan CK AE1/3 (-), Vimentin (+/-), CD45 (-), S100 i/або HMB45 (+)] безпігментної меланоми в порівнянні з звичайними лімфоцитами, мкм. А – характеристики периметру звичайних лімфоцитів (еталон), Б – меланома.

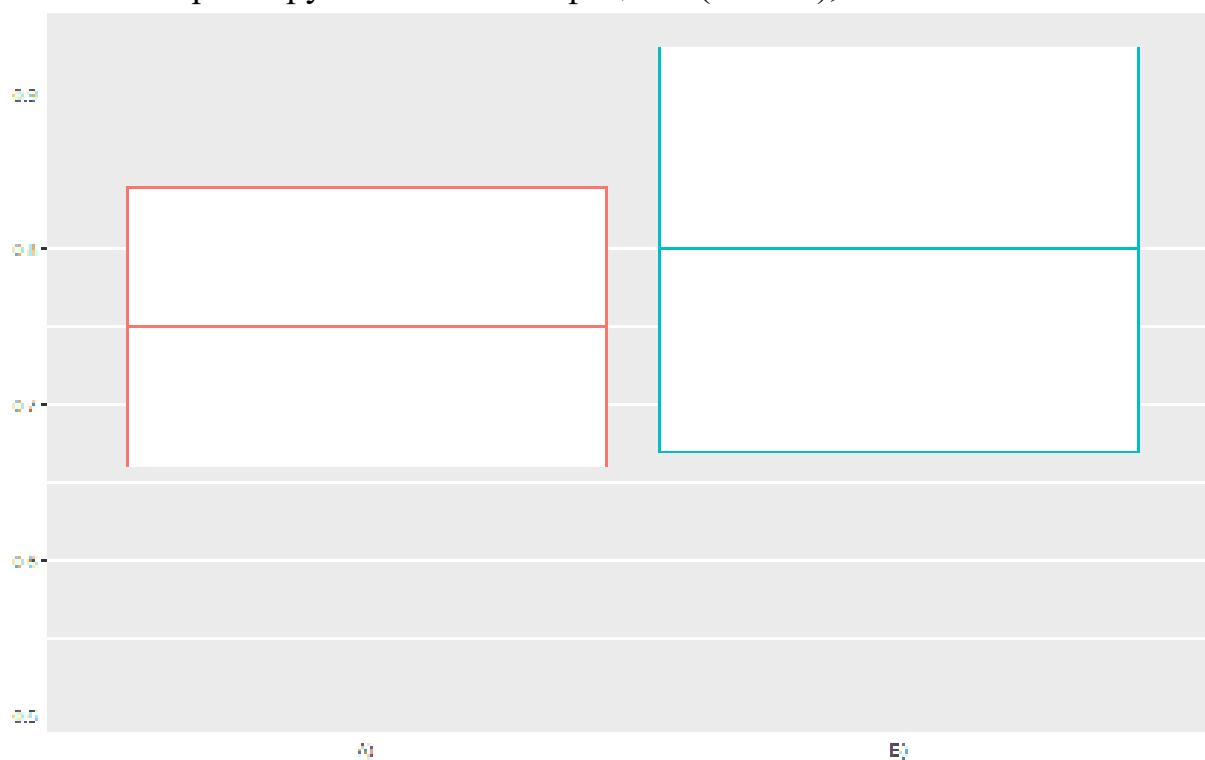


Рисунок 3.21 – Морфометричні показники коефіцієнту круглості фенотипу [Pan CK AE1/3 (-), Vimentin (+/-), CD45 (-), S100 i/або HMB45 (+)] безпігментної меланоми в порівнянні з звичайними лімфоцитами. А – характеристики коефіцієнту круглості звичайних лімфоцитів (еталон), Б – меланома.

Третій фенотип [Pan CK AE1/3 (-), CD45 (-), Vimentin (+), S100 i/або HMB45 (-)] включав лише 2 метастази з 41 (4,88 %) і характеризувався одним позитивним маркером з всієї первинної панелі - **Vimentin** (+) та середніми параметрами площі й периметрів ядер клітин (рис. 3.22 і рис. 3.23 відповідно), але різними коефіцієнтами круглості (рис. 3.24). Саме параметри МФМ аналізу віддзеркалюють особливості морфологічної будови виключно Vimentin (+) ушкоджень ЛВШ.

Параметри першого випадку третього фенотипу містили достатньо круглі ($0,74 \pm 0,14$), але трохи поліморфні, ядра клітин середнього розміру $43,53 \pm 10,79 \text{ мкм}^2$ та $26,30 \pm 3,37 \text{ мкм}$ з високим ядерно-цитоплазматичним коефіцієнтом (мало цитоплазми) і однорідним хроматином без ядерець. Остаточний діагноз після другого етапу ІГХ виявився метастаз [Desmin (+), EGFR (-)] альвеолярної рабдоміосаркоми, що відноситься до ДКСП м'яких тканин.

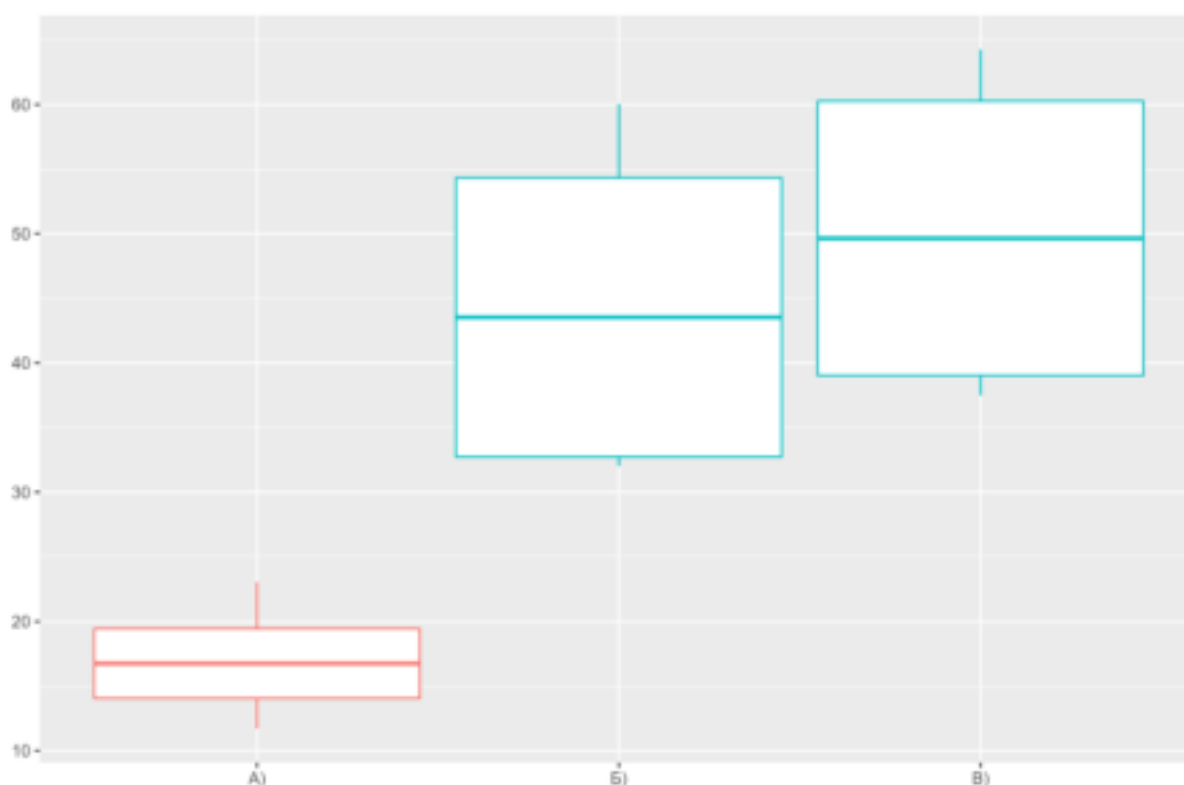


Рисунок 3.22 – Морфометричні показники площі фенотипу [Pan CK AE1/3 (-), Vimentin (+), CD45 (-), S100 i/або HMB45 (-)] мезенхімальних пухлин в порівнянні з звичайними лімфоцитами, мкм^2 . А – характеристики площі звичайних лімфоцитів (еталон), Б – альвеолярна рабдоміосаркома, В - фібрросаркома.

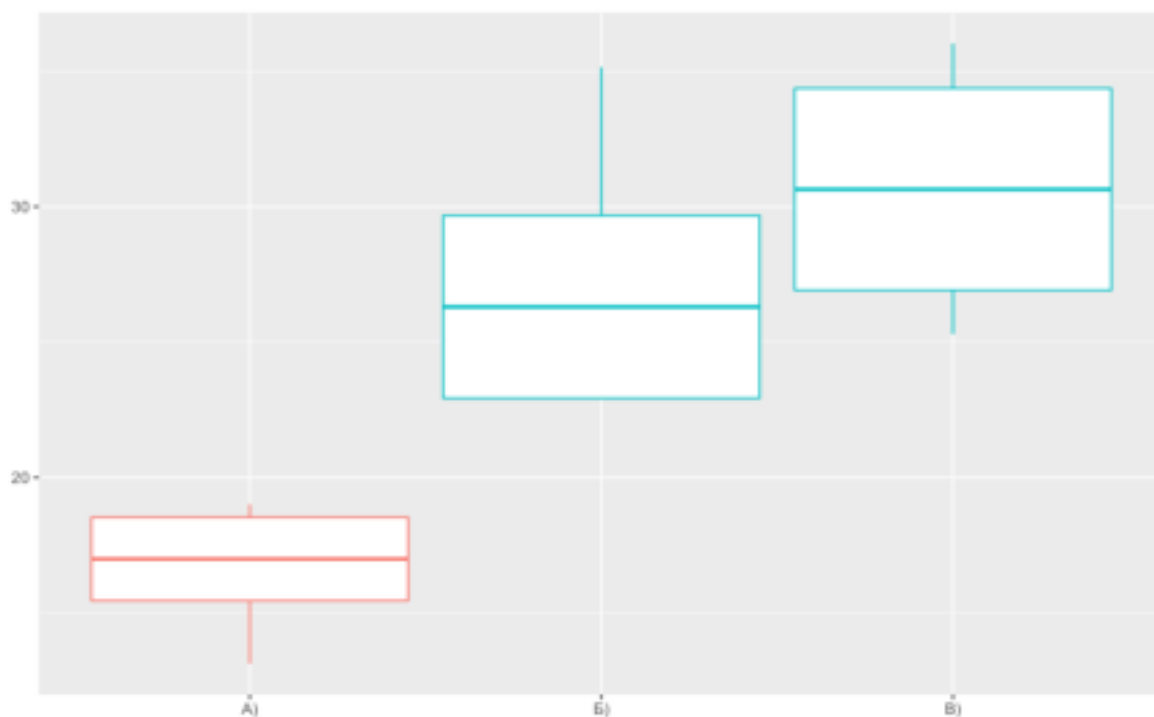


Рисунок 3.23 – Морфометричні показники периметру фенотипу [Pan CK AE1/3 (-), Vimentin (+), CD45 (-), S100 і/або HMB45 (-)] мезенхімальних пухлин в порівнянні з звичайними лімфоцитами, мкм. А – характеристики периметру звичайних лімфоцитів (еталон), Б – альвеолярна рабдоміосаркома, В - фібросаркома.

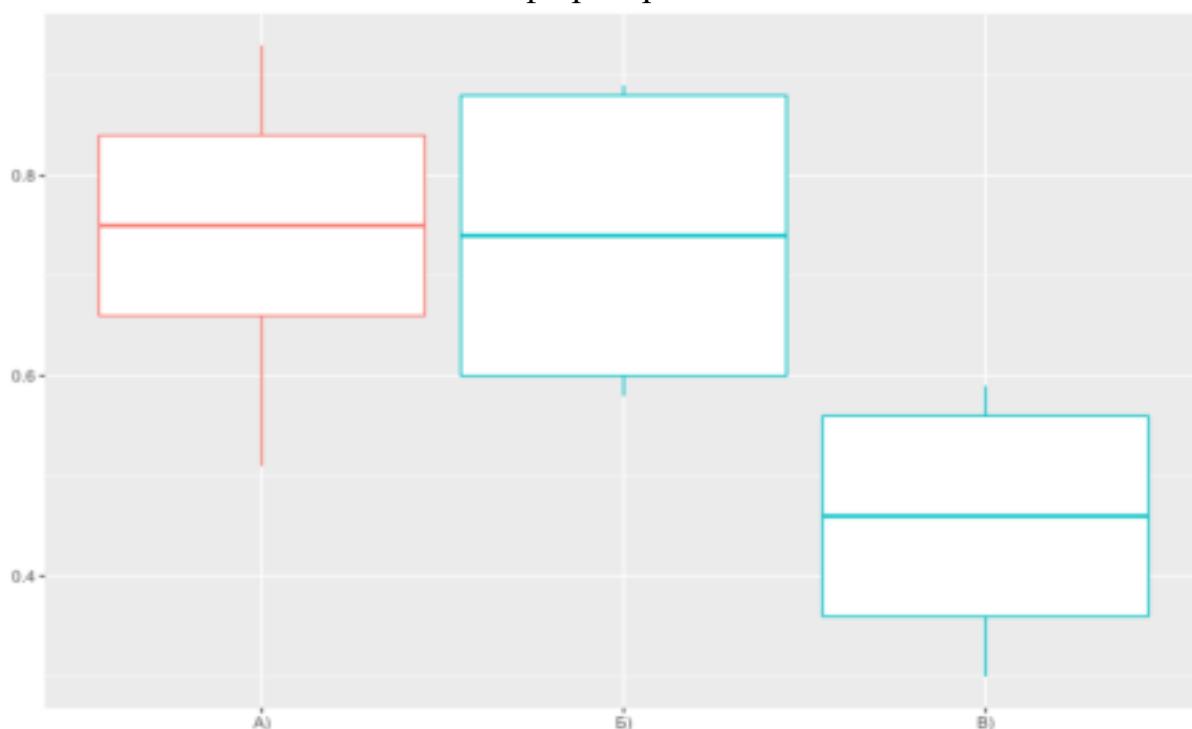


Рисунок 3.24 – Морфометричні показники коефіцієнту круглості фенотипу [Pan CK AE1/3 (-), Vimentin (+), CD45 (-), S100 і/або HMB45 (-)] мезенхімальних пухлин в порівнянні з звичайними лімфоцитами. А – характеристики коефіцієнту круглості звичайних лімфоцитів (еталон), Б – альвеолярна рабдоміосаркома, В - фібросаркома.

В другому випадку – це злоякісна пухлина з яскравим мезенхімо-подібною диференціацією, таким як дифузно розташовані веретеноподібні клітини з витягнутими ядрами ($0,46 \pm 0,1$) середнього розміру (за площею $49,64 \pm 10,61$ мкм² та за периметром $30,64 \pm 3,73$ мкм) без десмопластичної реакції та формування скупчень клітин, характерно, що судини розміщались безпосередньо між пухлинними клітинами. Після уточнення діагнозу на ІГХ був виставлений діагноз фібросаркоми.

Для порівняння морфології всіх підгруп [Pan CK AE1/3 (-), Vimentin (+, +/-)] метастазів в ЛВШ мікрофотографії зрізів наведені на рисунку 3.25 в порядку збільшення розмірів клітин від дрібноклітинної лімфоми (А) до фібросаркоми (Д).

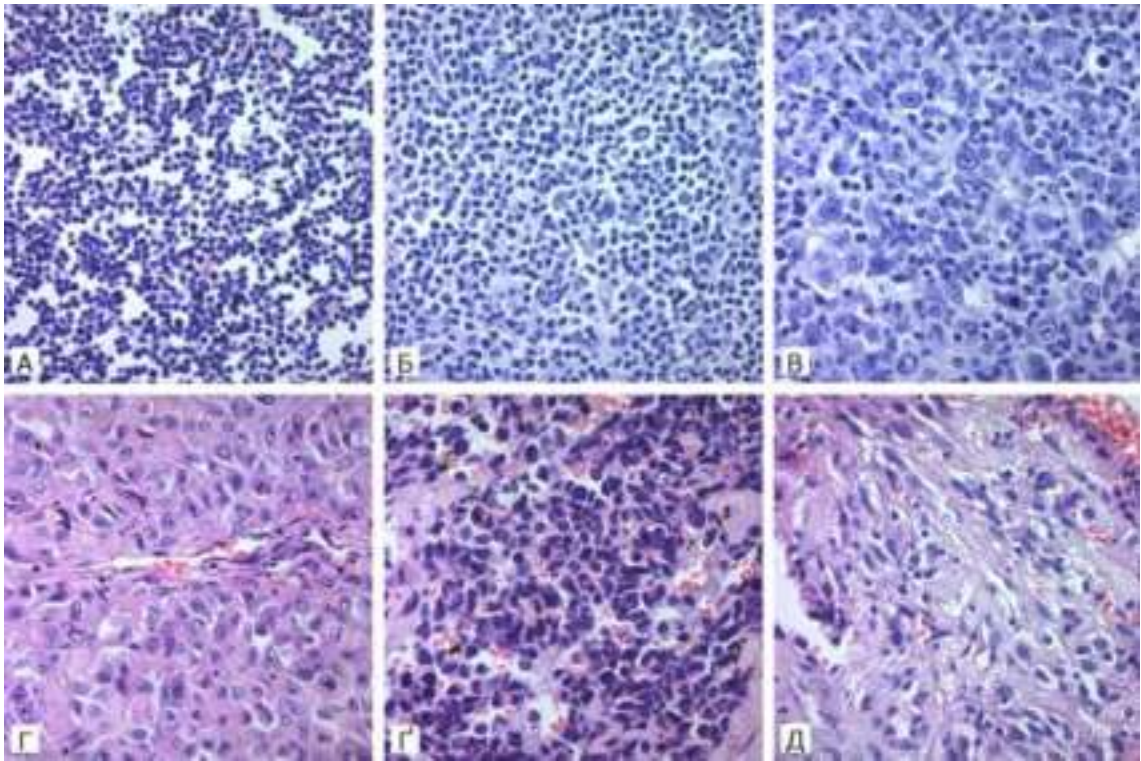


Рисунок 3.25 – Порівняння морфології [Pan CK AE1/3 (-), Vimentin (+)] метастазів в ЛВШ, забарвлення гематоксилином і еозином. Зб.: $\times 400$. А. Підгрупа 1.1 [Vimentin (+), CD45 (+)]: лімфома із малих лімфоцитів / хронічний лімфолейкоз. Б. Підгрупа 1.2 [Vimentin (+), CD45 (+), CD20 (+)]: дифузна велико-клітинна В-клітина лімфома. В. Підгрупа 1.3 [Vimentin (+), CD45 (+)]: класичний варіант лімфоми Ходжкіна. Г. Підгрупа 2: [Vimentin (+), S100 і/або НМВ45 (+)] метастаз безпігментної меланоми. Г. Підгрупа 3: метастаз [Vimentin (+), Desmin (+), EGFR (-)] альвеолярної рабдоміосаркоми. Д. Підгрупа 3: метастаз Vimentin (+) фібросаркоми.

Підсумовуючи МФМ дослідження пухлин різного гістогенезу, їх можна розподілити на три групи за розмірами відносно розмірів звичайних лімфоцитів лімфатичного вузла: дрібно-, середньо- та великоклітинні (табл. 3.11). Особливу увагу треба приділити категорії дрібно-кругло-синьо-клітинних пухлин, що зазвичай викликають труднощі в морфологічній діагностиці. За нашими спостереженнями (карцинома з клітин Меркеля, альвеолярна рабдоміосаркома, меланома, неспецифіцирована периферійна Т-клітинна лімфома, хвороба Кастлемана, низькодиференційовані АК й недиференційовані карциноми, що за морфологією відповідали категорії дрібно-кругло-синьо-клітинних пухлин, не попали в категорію дійсно дрібноклітинних пухлин, як очікувалось, а продемонстрували МФМ показники середньоклітинних пухлин, але з коефіцієнтом круглості, що близьвся до одиниці (0,75-0,90), подібно до ЗЛ (табл. 3.11).

Таблиця 3.11 – Розподіл пухлин за морфометричними показниками програми ImageJ, порівняно з звичайними лімфоцитами лімфатичного вузла, мкм^2 , мкм

Категорія пухлин за розміром	Площа ядер клітин (мкм^2)	Периметр ядер клітин (мкм)	Коефіцієнт круглості ядер клітин
Звичайні лімфоцити ЛВШ (еталон МФМ) ($M \pm SD$)	16,74 \pm 2,69	15,99 \pm 1,54	0,75 \pm 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. $M \pm SD$ – середнє значення \pm стандартне відхилення, ЛВШ – лімфатичний вузол ший, МФМ – морфометричне дослідження.

Таким чином, діапазони МФМ показників в програмі ImageJ 30 – 45 мкм^2 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 вибору замість стандартної первинної па-

нелі маркерів [**Pan CK AE1/3, CD45, Vimintin, S100 і/або HMB45**], іншу більш розширену і адаптовану саме для дрібно-кругло-синьо-клітинних пухлин [**Pan CK AE1/3, Desmin, CD45, CD56, CD99, S100 і/або HMB45**].

Орієнтуючись на класифікацію National Institute for Health and Care Excellence (Australia), за Vajdic C. M., Goldstein D., (2015) [10], яка поділяє всі РНПЛ на три групи за категорією верифікації, після аналізу результатів ІГХ з 41 випадку ізольованого ураження ЛВШ без клінічної маніфестації первинного джерела (категорія 1 "злоякісні новоутворення невідомого походження") відокремились наступні групи :

1) «не карциноми» (27 із 41; 65,85 %) з фенотипами [Pan CK AE1/3 (-), Vimentin (+/-) або (+)]: а саме 23 CD45 (+) 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 нирковоклітинний рак, папілярний рак щитоподібної залози, протокова карцинома молочної залози, АК яєчника;

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

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

3.2. несприятливі фенотипи клініко-морфологічного синдрому РНПЛ (6 з 41; 14,63 %): аденогенні низькодиференційовані карциноми з фенотипами [Pan CK AE1/3 (+), Vimentin (+ або -), CK 7 (+)] та НДР тільки з [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 з патогістологічними діагнозами: метастаз недиференційованого раку, метастаз помірно- або низькодиференційованої АК, ме-

тастаз помірно- або низькодиференційованого ПР з негативними реакціями органоспецифічних маркерів, метастаз недиференційованого аденогенного раку, метастаз ККМ. І тільки 3 карциноми (3 з 9; 33,33 %) потрапили до списку сприятливих імунофенотипів РНПЛ, як ПР, що вражає виключно ЛВШ та метастаз ККМ будь-якої первинної локалізації, інші 6 (66,67 %) – несприятливі імунофенотипи РНПЛ.

Таким чином, на практиці пацієнти тільки після такої «неоднозначної» патогістологічної відповіді були направлені лікарями-клініцистами на пошук локалізації шляхом дообстеження на КТ або МРТ, до цього наївно розраховуючи на відповідь морфолога та ігноруючи клініко-морфологічний підхід до формування діагнозу. В наслідок цього, сумнівні випадки попадають в категорію 3 «підтверджений РНПЛ», штучно змінюючи дані статистики онкологічних захворювань.

Резюме. Пацієнти, у яких ураження лімфатичних вузлів стало першими клінічними проявами онкозахворювання, завжди потребують проведення додаткового ІГХ дослідження для уникнення діагностичних помилок.

В діагностиці метастазів недиференційованих (анапластичних) пухлин та пухлин без відомого первинного джерела доцільно виконувати морфометричне дослідження мікрофотографій зрізів, забарвлених гематоксиліном і еозином, для вимірювання об'єктивних параметрів ядер пухлинних клітин (площа, периметр, коефіцієнт «круглості») з метою відокремлення категорії дрібно-кругло-синьо-клітинних пухлин (30 - 45 мкм² за площею, 25 – 35 мкм за периметром, 0,75-0,90 за коефіцієнтом круглості) й отримання об'єктивних підстав заміни стандартної первинної ІГХ панелі з [**Pan CK AE1/3, CD45, Vimintin, S100 i/або HMB45**] на більш розширену і адаптовану саме для дрібно-кругло-синьо-клітинних пухлин [**Pan CK AE1/3, Desmin, CD45, CD 56, CD 99, S100 i/або HMB45**].

Аналіз фотографій інформативних полів зору пухлин в програмі обробки цифрових зображень ImageJ, що має вільний доступ та розроблена саме для біомедичних наукових досліджень, не потребує додаткових економічних

витрат й зменшує суб'єктивність розподілу недиференційованих (анапластичних) пухлин за розмірами: дійсно дрібноклітинні (до 30 мкм² за площею, до 25 мкм за периметром, різні за коефіцієнтом круглості), середньо- (30 - 50 мкм² за площею, 25 – 35 мкм за периметром, різні за коефіцієнтом круглості) та великоклітинні (більше 50 мкм² за площею, більше 35 мкм за периметром, різні за коефіцієнтом круглості) пухлини, що суттєво допомагає визначити діагностичний алгоритм другого етапу ІГХ дослідження.

Найбільш поширений фенотип метастатичних карцином відповідає [Pan CK AE1/3 (+), Vimintin (-)], але більше чверті метастазів 28,57 % (4 з 14), продемонстрували коекспресію цитокератинів та віментину [Pan CK AE1/3 (+), Vimintin (+)] (світлоклітинна карцинома нирок, папілярний рак щитоподібної залози та аденогенні низькодиференційовані карциноми), що треба враховувати при верифікації метастазів недиференційованих (анапластичних) карцином та карцином без встановленої первинної локалізації.

Фенотип меланоцитарних пухлин відповідає [Pan CK AE1/3 (-), Vimintin (+/-), S100 (+/-), HMB45 (+)], що передбачає використання цих маркерів разом і обов'язкове включення останнього маркера HMB45 в первинну ІГХ панель, через безпігментні форми меланом, які суттєво змінюють свою морфологію, симулюючи карциноми та лімфопроліферативні захворювання, та часто потрапляючи в категорію дрібно-кругло-синьо-клітинних пухлин.

Відсоток випадків непластичних уражень ЛВШ 3 категорії «підтверджений РНПЛ» значно перевищує показники світової статистики, внаслідок неповного клінічного обстеження пацієнтів на «до-біопсійному етапі», або, іншими словами, відсутності клініко-морфологічного підходу в формуванні діагнозу.

Основні положення цього розділу опубліковані в 5-и статтях [189-193] і 5-и тезах [194-198].

РОЗДІЛ 4

РОЗПОДІЛ ГІСТОЛОГІЧНИХ ВАРІАНТІВ, ІМУНОГІСТОХІМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ТА МОРФОМЕТРИЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ СПРИЯТЛИВИХ ФЕНОТИПІВ АДЕНОКАРЦИНОМ КЛІНІКО- МОРФОЛОГІЧНОГО СИНДРОМУ «РАК НЕВІДОМОЇ ПЕРВИННОЇ ЛОКАЛІЗАЦІЇ»

4.1 Жінки з ізольованим папілярним канцероматозом очеревини

Для дослідження були відібрані «попередні РНПЛ», отримані шляхом лапароскопічної біопсії у жінок з ознаками асцити в наслідок ізольованого папілярного канцероматозу (ІПК) очеревини без інших відомих ділянок пухлинного росту, з відповідним імунофенотипом метастазів епітеліальних пухлин після первинної панелі ІГХ маркерів: [Pan CK AE1/3 (+), Vimentin (-) або Vimentin (-/+), CD45 (-), S100 і/або HMB45 (-)].

Ретроспективна перевірка патогістологічних характеристик показала, що всі відібрані зразки канцероматозу (n=24) відповідали «епітеліоїдній» морфології. Найбільший відсоток ІПК – 62,5 % (15 із 24) продемонстрував папілярні структури із серозним невисоким типом епітелію подібного до серозної «high-grade» аденокарциноми яєчників (АКЯ) (рис. 4.1 А).

Інші – «несерозні» аденокарциноми (АК) різного ступеня диференціювання 20,83 % (5 із 24) із слизом (рис. 4.1 Б) та без (рис 4.1 В), що могли походити також із гастро-інтестинального тракту; муцинозні АК 8,33 % (2 із 24) із високими світлими стовпчастими клітинами, які вирізнялись масивною еозинофільною цитоплазмою (рис. 4.1 Г); дрібно-кругло-клітинна епітеліальна пухлина з розташуванням клітин гніздами – нейроендокринна пухлина (НЕП) 4,17 % (1 із 24) (рис. 4.1 Г); та мезотеліома, що нагадувала пограничну пухлину яєчників із невеликими плоскими клітинами, які формували сосочкові вирости 4,17 % (1 із 24) (рис. 4.1 Д). Зазвичай це й є типові гістологічні форми Pan CK AE1/3 (+) канцероматозу, походження яких стає діагностичною

проблемою з необхідністю проведення ІГХ в зв'язку з верифікацією «попередніх РНПЛ».

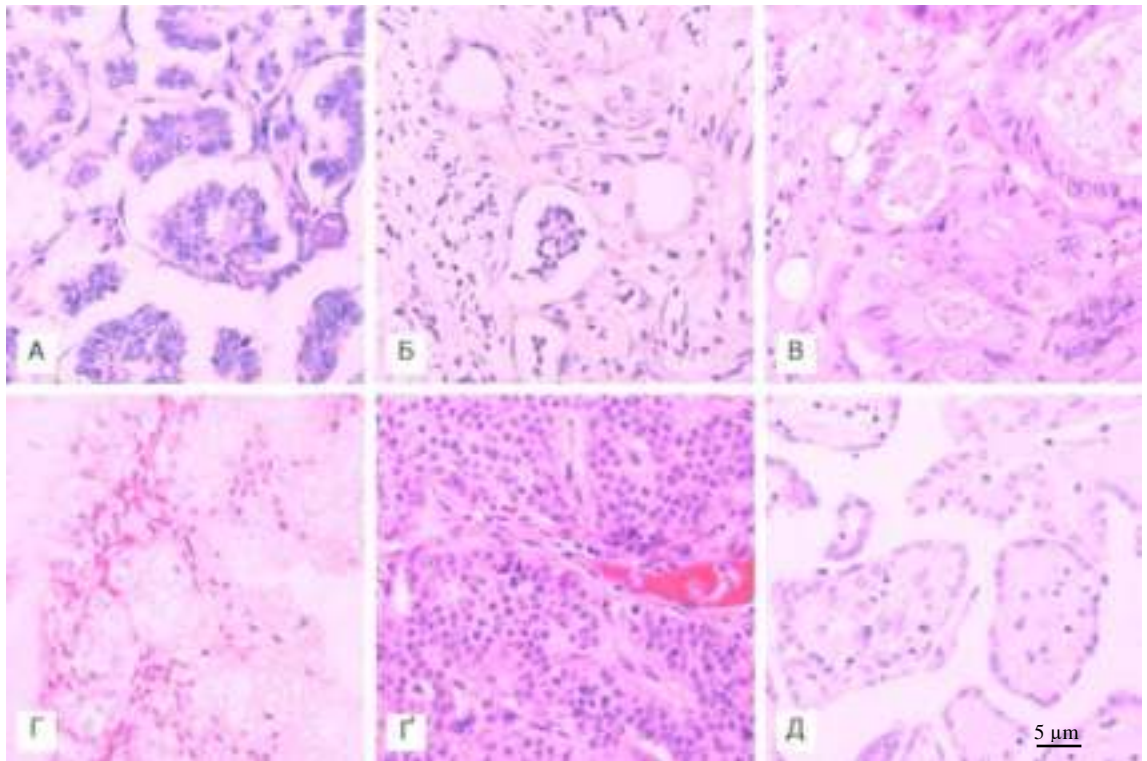


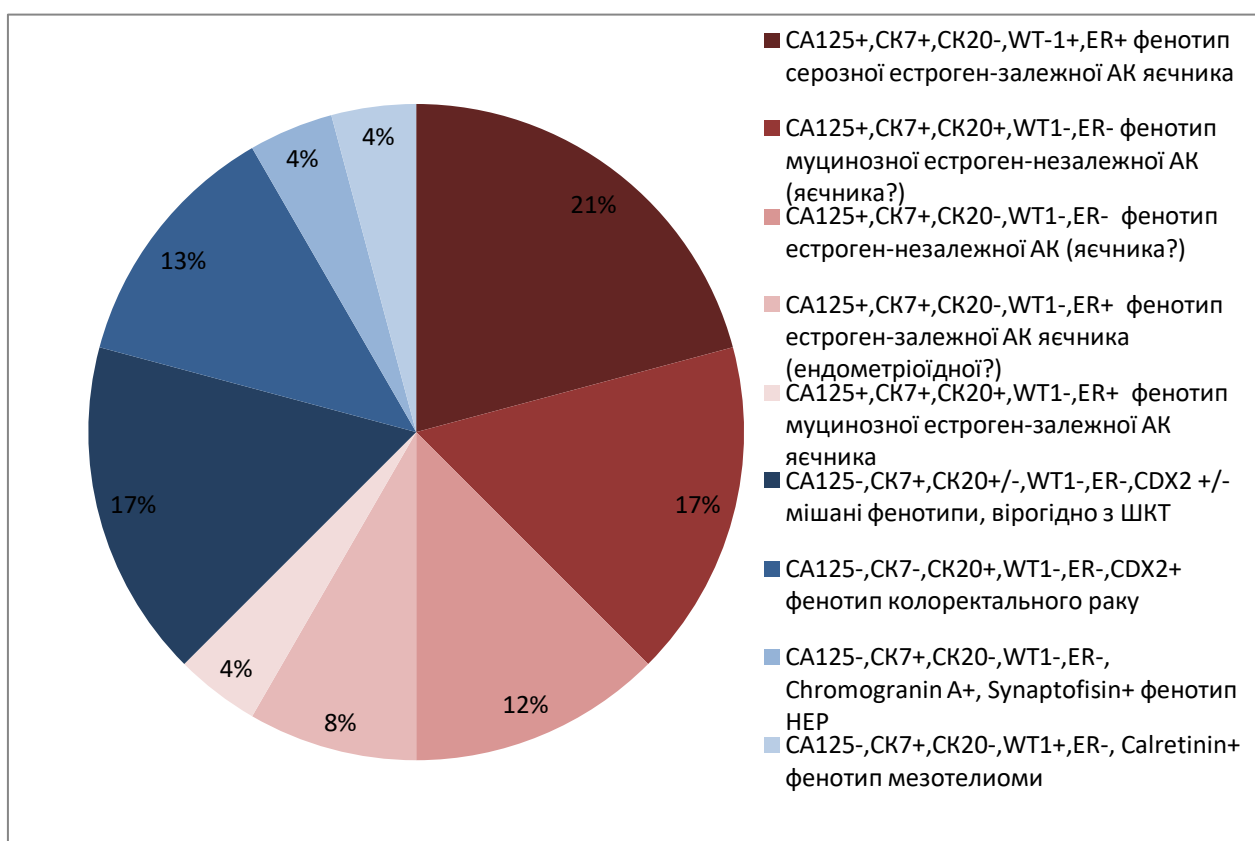
Рисунок 4.1 – Гістологічні варіанти ІПК, забарвлення гематоксиліном та еозином. А. Серозна папілярна АК. Б. Низькодиференційована АК із внутрішньоклітинним накопиченням слизу. В. Помірnodиференційована АК. Г. Муцинозна АК із світлою еозинофільною цитоплазмою. Д. Дрібно-круглоклітинна епітеліальна пухлина (вірогідно НЕП). Е. Мезотеліома. Зб.: $\times 400$.

4.1.1 Порівняння імуногістохімічних та морфометричних характеристик ізольованого папілярного канцероматозу у жінок в якості фенотипу клініко-морфологічного синдрому «Рак невідомої первинної локалізації» та первинних пухлин яєчників

Друга панель ІГХ ставила собі за мету відокремити з групи різних ІПК імунофенотипи АК, які походять з яєчника для обґрунтування доцільності лікування такого фенотипу РНПЛ як дисемінованої форми раку яєчників. Для первинних АКЯ притаманна позитивна експресія СК 7, СА-125, ER, WT-1, PAX-8 (останні в серозних АК), частково СК 20, CDX-2 (тільки в муцинозних).

Маркер СК 7 в групі зразків з ІПК був позитивним в 83,33 % (20 із 24) РНПЛ, СА-125 трохи менше – в 66,67 % (16 із 24), всі з яких мали СК 7 імунореактивність, але тільки 37,50 % (9 із 24) з ІПК показали експресію рецепторів стероїдних гормонів (ER+, PGR+) і в 20,83 % (5 із 24) вірогідний серозний фенотип (WT-1+, PAX-8+). Особливістю морфологічної картини було те, що СА-125 (+/-) частково позитивні ділянки метастатичних АК були змішані з недиференційованими, непапілярними пухлинними патернами ІПК. З клінічних характеристик відзначився вік жінок з імунотипами АКЯ, який був трохи більшим, ніж всієї групи ІПК (середній вік 61,4±10,08 років), але вірогідної відмінності не продемонстрував ($p>0,05$).

Поєднання ІГХ маркерів дало 9 варіантів ІПК у жінок: п'ять в першій підгрупі – СА-125 (+) вірогідно з яєчників (рис. 4.2 червона палітра) та чотири в другій – СА-125 (-) (рис. 4.2, синя палітра).



Примітка. СК – цитокератини, АК – аденокарцинома, ER – естрогенові рецептори, НЕР – нейроендокринний рак.

Рисунок 4.2 – Розподіл варіантів ізольованих канцероматозів за імунотипом: СА-125 (+) (червона палітра) та СА-125 (-) (синя палітра), %.

Як бачимо на діаграмі рисунку 4.2, серед СА-125 (+) підгрупи найбільш розповсюджений фенотип 20,83 % (5 із 24) відповідав естроген-залежній ЕР (+) серозній АКЯ [СК 7 (+), СА-125 (+), СК 20 (-), ЕР (+), Vimentin (-), WT-1 (+), PAX-8 (+)] (рис. 4.3). На фенотип [ЕР (+), WT-1 (-)] АКЯ припало всього 8,33 % (2 із 24). Фенотип естроген-негативної ЕР (-) муцинозної АК з яєчника [СК 7 (+), СА-125 (+), СК 20 (+), ЕР (-), Vimentin (-), WT-1 (-)] були в 16,67 % (4 із 24). Треба зазначити, що подібний імунофенотип, який відрізняється лише ЕР (+) посів лише 4,16 % (1 з 24) ІПК. Останні 12,5 % (3 з 24) СА-125 (+) ІПК показали фенотип [СК 7 (+), СА-125 (+), СК 20 (-), ЕР (-), Vimentin (-/+), WT-1 (-), PAX-8 (+)], що відповідає ендометріюїдним первинним АКЯ.

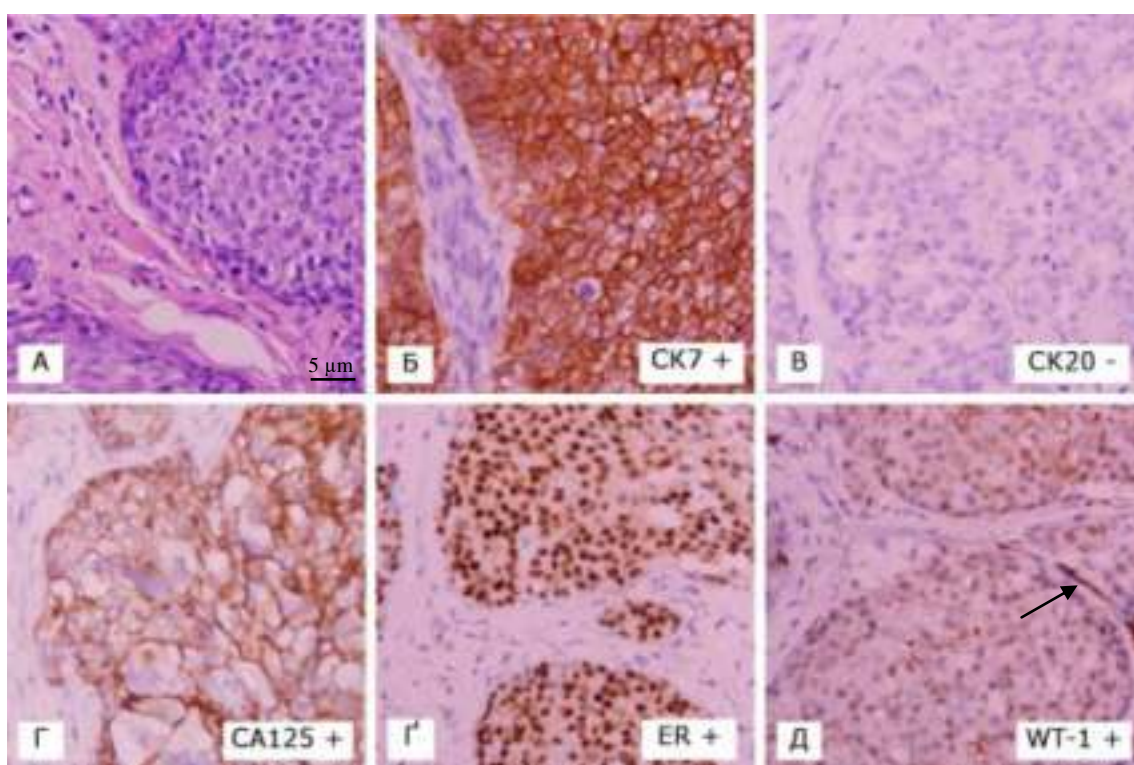


Рисунок 4.3 – Найбільш поширений варіант ізольованого папілярного канцероматозу, що відповідає фенотипу серозної естроген-залежної АКЯ. А. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Б. Дифузна інтенсивна цитоплазматична експресія СК 7. В. Негативна реакція з СК 20. Г. Мембрана реакція муцину 16 типу СА-125. Е. Інтрануклеарна експресія естрогенових рецепторів (+++). Д. Інтрануклеарна експресія WT-1 (стрілка показує позитивний внутрішній контроль в ендотелії судин). Б – Д. ІГХ з додатковим забарвленням гематоксиліном Майєра. Зб.: ×400.

Треба більш детально зупинитись на фенотипах [СК 7 (+), СА-125 (+)] ІПК у жінок, що мають негативний статус за естрогеновими рецепторами та навіть інколи СК 20 (+) пухлинні патерни. Велика вірогідність походження цих карцином з ШКТ робить неефективним лікування ІПК як форм дисемінованого раку яєчників, і такі варіанти РНПЛ навіть після ІГХ (не зважаючи на приблизно знайдене джерело походження) можна відносити до третьої категорії «підтвержені РНПЛ».

Друга підгрупа СА-125 (-) ІПК включала: 4,17 % (1 з 24) нейроендокринних пухлин з [СК 7 (-), Chromogranin A (+), Synaptophysin (+)]; 4,17 % (1 з 24) мезотеліом – [СК 7 (+), Vimentin (+), WT-1 (+), СА-125 (-), СК 20 (-), ER (-), Calretinin (+)], 12,5 % (3 з 24) КРР з фенотипом [СК 20 (+), CDX-2 (+), СК 7 (-), СА-125 (-), ER (-), Vimentin (-), WT-1 (-)]; й 16,67 % (4 із 24) мішаних фенотипів, вірогідно із верхніх відділів ШКТ – [СК 7 (+), СА-125 (-), СК 20 (+/-), ER (-), Vimentin (+/-), WT-1 (-), CDX-2 (+/-)] (рис. 4.4).

З рис. 4.4 видно, що використовуючи комбінацію з трьох маркерів СК 7, СК 20 та WT-1, можна провести диференційну діагностику СА-125 (-) дисемінованих процесів в черевній порожнині. Але якщо для КРР специфічним позитивним маркером є CDX-2, для мезотеліоми – Calretinin, для НЕП – Chromogranin A та / або Synaptophysin, то найбільш невизначеними виявились метастази АК з верхніх відділів ШКТ (панкреато-біліарні, шлункові, дуоденальні та холангіоцелюлярні АК), які не мають органоспецифічних маркерів і стають діагнозом виключення, що також робить їх кандидатами в категорію «підтвержені РНПЛ».

Мікрофотографії зрізів отриманих варіантів ІПК підлягали морфометричному дослідженню в програмі ImageJ з метою отримання об'єктивних розмірів (табл. 4.1). Найбільші розміри площ та периметрів з овальними ядрами мали муцинозні АК обох підгруп, що були подібними до КРР; найменші та найкругліші ядра продемонструвала НЕП; пухлини з середніми розмірами овальних ядер були АКЯ та АК з верхніх відділів ШКТ; плоскі ядра середніх за розміром клітин мала мезотеліома.

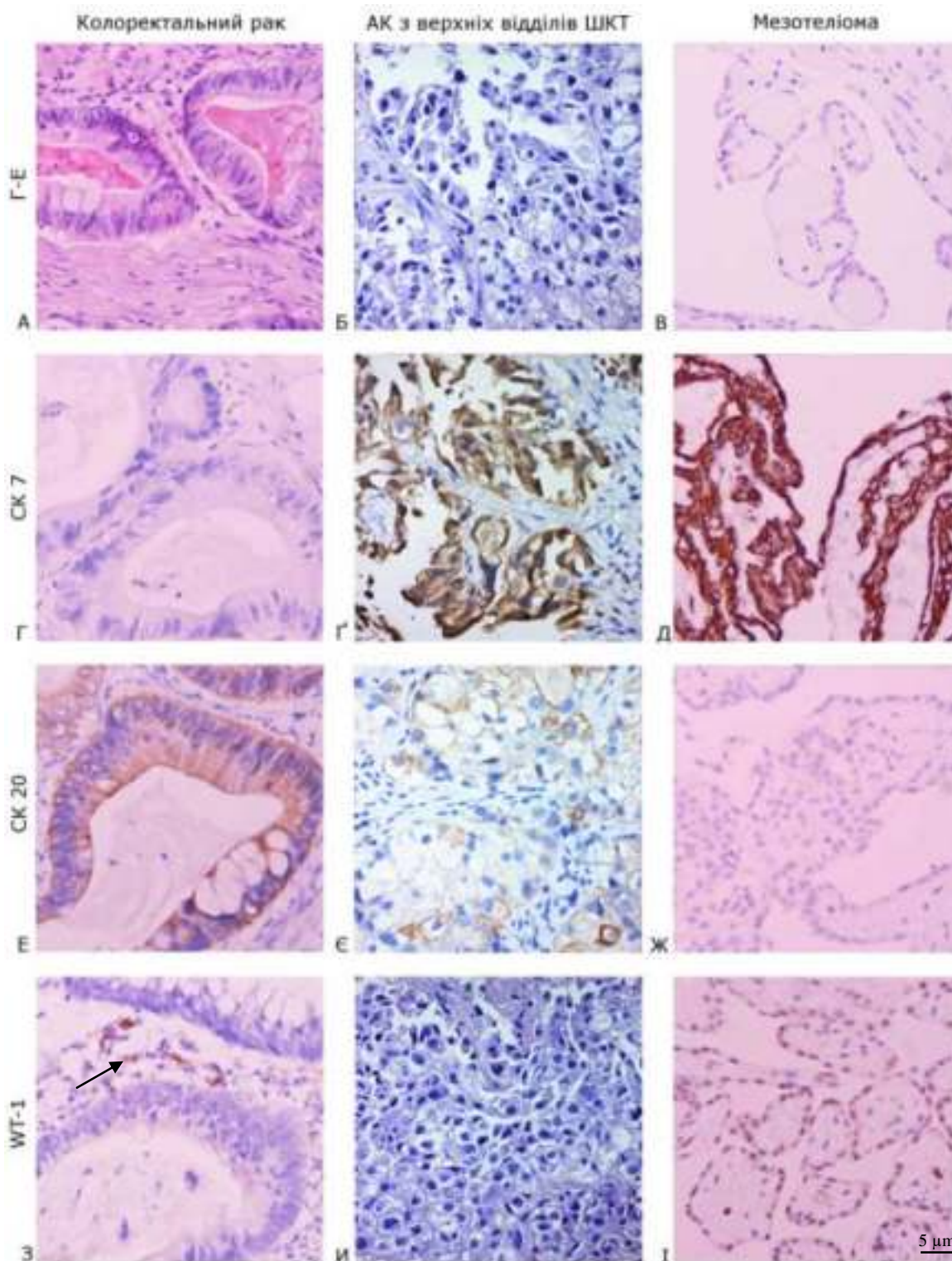


Рисунок 4.4 – Варіанти СА-125 (-) групи ПК. А – В. Забарвлення гематоксином та еозином. Г – Д. Експресія СК 7, ІГХ з додатковим забарвленням гематоксином Майєра. Е – Ж. Експресія СК 7, ІГХ з додатковим забарвленням гематоксином Майєра. З – І. Експресія WT-1 (стрілка показує позитивний внутрішній контроль в ендотелії судин), ІГХ з додатковим забарвленням гематоксином Майєра. Зб.: $\times 400$.

Таблиця 4.1 – Показники морфометричного дослідження ядер клітин пухлин з фенотипів ізольованого папілярного канцероматозу у жінок у програмі ImageJ, n, M±SD, мкм², мкм

	Варіанти ізольованого папілярного канцероматозу	Площа я/к (мкм ²)	Периметр я/к (мкм)	Коефіцієнт круглості я/к
СА-125 (+) / СК7 (+) імунофенотипи ППК	СА-125+, СК7+, СК20+, WT-1-, ER+, PAX-8-, Calretinin- фенотип муцинозної естроген-залежної АК яєчника, (n=1)	70,7±17,3	32,2±3,6	0,79±0,14
	СА-125+, СК7+, СК20+, WT-1-, ER-, PAX-8-, Calretinin- фенотип муцинозної естроген-незалежної АК яєчника, (n=4)	66,7±4,0	30,2±1,9	0,75±0,13
	СА-125+, СК7+, СК20-, WT-1-, ER-, PAX-8-, Calretinin- фенотип низькодиференційованої естроген-незалежної АК яєчника, (n=3)	46,1±14,5	26,3±3,7	0,69±0,09
	СА-125+, СК7+, СК20-, WT-1+, ER+, PAX-8+, Calretinin- фенотип серозної естроген-залежної АК яєчника, (n=5)	36,1±8,1	22,4±2,5	0,81±0,13
	СА-125+, СК7+, СК20-, WT-1-, ER+, PAX-8+, Calretinin- фенотип естроген-залежної ендометріїдної АК яєчника, (n=2)	32,4±5,1	24,7±2,2	0,61±0,11
СА-125(-) імунофенотипи ППК	СА-125-, СК7-, СК20+, WT-1-, ER-, CDX-2+, PAX-8-, Calretinin- фенотип колоректального раку, (n=3)	67,8±16,8	33,7±2,9	0,61±0,17
	СА-125-, СК7+, СК20+/-, WT-1-, ER-, CDX-2 +/-, PAX-8-, Calretinin- мішані фенотипи, вірогідно з ШКТ, (n=4)	39,9±16,7	24,4±4,8	0,72±0,11
	СА-125-, СК7+, СК20-, WT-1 +, ER-, PAX-8-, Calretinin + фенотип мезотеліоми, (n=1)	30,4±3,4	22,2±1,6	0,59±0,09
	СА-125-, СК7+, СК20-, WT-1 -, ER-, PAX-8-, Calretinin-, Chromogranin A+, Synaptophysin+ фенотип НЕК, (n=1)	18,7±2,1	16,5±1,1	0,84±0,05

Примітка. n – кількість пухлин, M±SD – середнє значення ± стандартне відхилення, я/к – ядра клітин, ППК – ізольований папілярний канцероматоз, СК – цитокератини, АК – аденокарцинома, ER – естрогенові рецептори, ШКТ – шлунково-кишковий тракт, НЕК – нейроендокринна карцинома.

Діаграми на рисунках 4.5, 4.6 та 4.7 узагальнюють отримані дані за морфометричними дослідженнями (МФМ) «площі», «периметру», «коефіцієнту круглості» підгруп ІПК [СА-125 (+), СК 7(+), PAX-8 (+/-)] – вірогідно з яєчників (рожеві стовбці) та [СА-125 (-), СК 7(-/+), PAX-8 (-)] – вірогідно ІПК іншого походження.

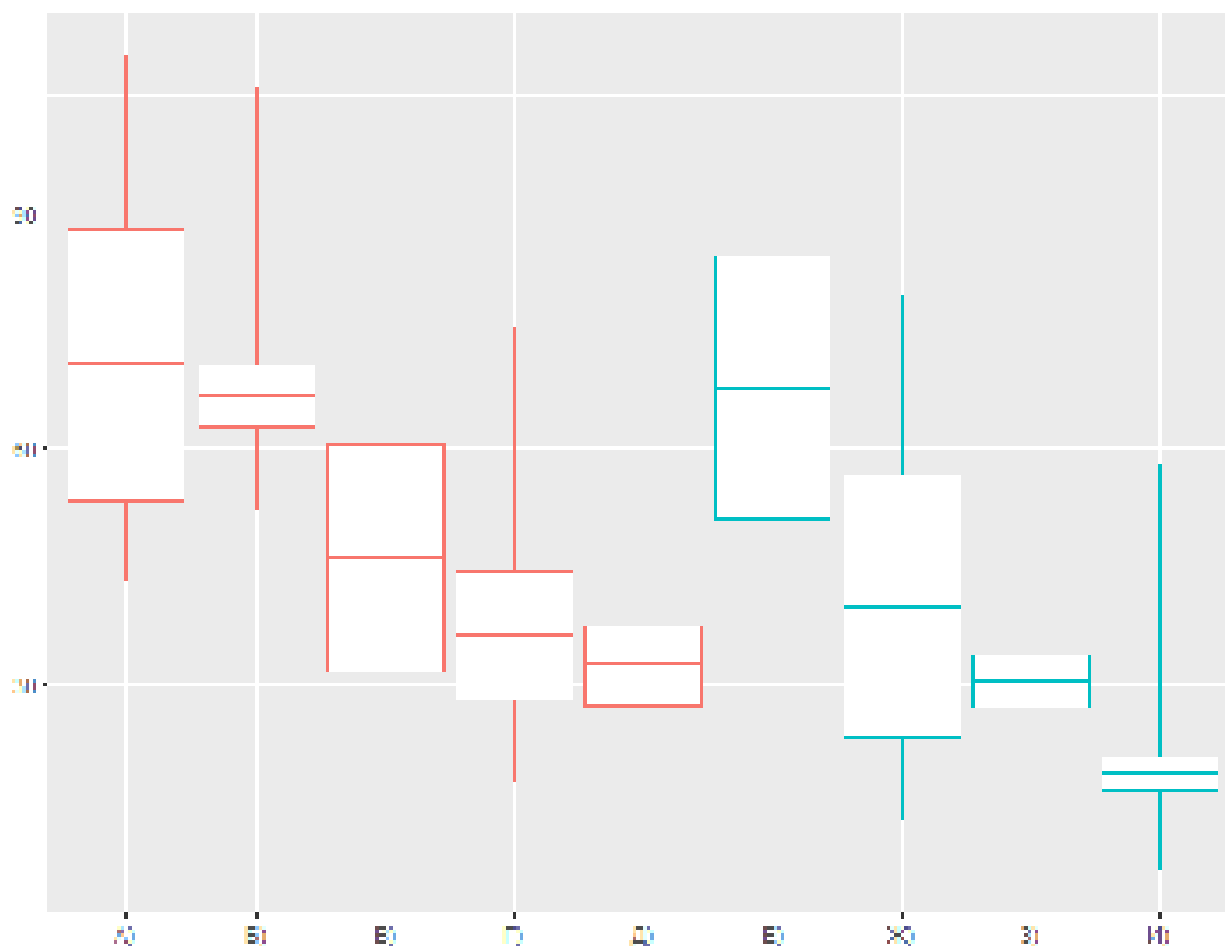


Рисунок 4.5 – Морфометричні показники площі ядер клітин підгруп ІПК, мкм². А – муцинозна ER (+) АК яєчників, Б – муцинозна ER (-) АК яєчників, В - неспецифікована ER (-) АК яєчників, Г - серозна ER (+) АК яєчників, Д - ендометріоїдна ER (+) АК яєчників; Е – колоректальний рак, Ж - АК верхніх відділів ШКТ, З - мезотеліома, И – нейроендокринна карцинома.

Візуалізація розмірів на рисунках 4.5 та 4.6 дає можливість виділити АК подібні за розмірами, які потребують ретельної диференційної діагностики, а саме: муцинозні АКЯ та КРР, низькодиференційована ER (-) АКЯ та АК верхніх відділів ШКТ, серозну ER (+) АКЯ та мезотеліому. Але коефіцієнт круглості в деяких випадках дає можливість їх розрізнити: у КРР ядра клітин

більш витягнуті та поліморфні, ніж у муцинозних АКЯ, така ж ситуація з мезотеліомою, чії ядра однаково сплюснені та витягнуті, натомість серозна АКЯ демонструє значно кругліші ядра з більшим поліморфізмом (рис. 4.7).

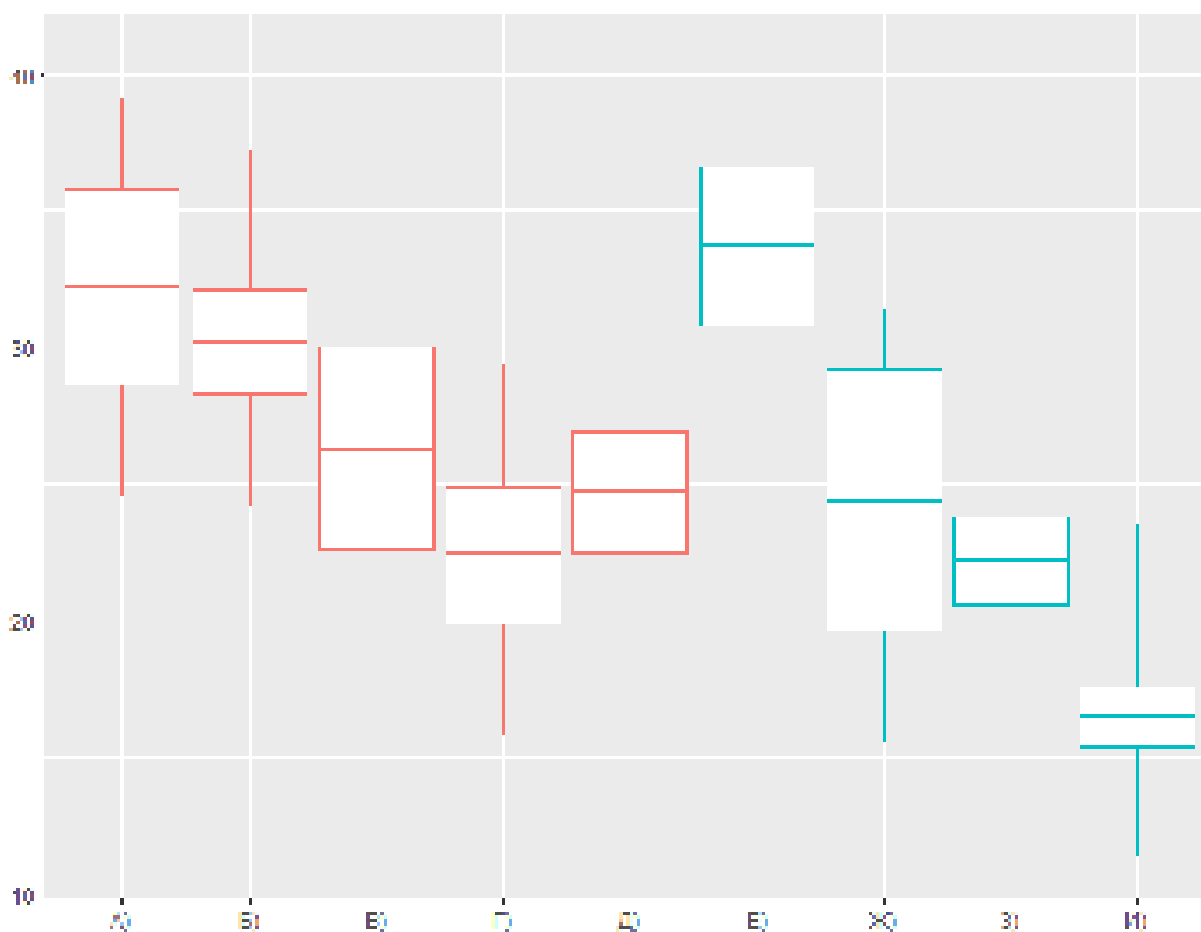


Рисунок 4.6 – Морфометричні показники периметру ядер клітин підгруп ІПК, мкм. А – муцинозна ER (+) АК яєчників, Б – муцинозна ER (-) АК яєчників, В - неспецифікована ER (-) АК яєчників, Г - серозна ER (+) АК яєчників, Д - ендометріодна ER (+) АК яєчників; Е – колоректальний рак, Ж - АК верхніх відділів ШКТ, З - мезотеліома, И – нейроендокринна карцинома.

Окремим імунофенотипом за розмірами та коефіцієнтом круглості є нейроендокринна карцинома, що демонструє найменші та найкругліші клітини із всіх ІПК, та немає аналогів серед імунофенотипів з вірогідним походженням з яєчників.

Спостереження з групи порівняння первинних пухлин яєчників ($n_2=46$) мали гістологічну картину серозної АКЯ в 52,17 % (24 із 46), ендометріодної АКЯ в 8,69 % (4 із 46), муцинозної або серо-муцинозної в 6,52 % (3 із 46),

світлоклітиної в 4,35 % (2 із 46) та низькодиференційованих варіантів карцином. ІГХ профіль первинних пухлин яєчників, подібно до СА-125 (+) підгрупи ІПК визначив найспецифічнішими маркерами СК 7 (цитокератин 7) і СА-125 (муцин 16), що в 93,48 % (43 із 46) та 80,43 % (37 із 46), відповідно, були позитивними хоча б частково. Але рецептори до естрогенів ER визначались лише в третині випадків 30,43 % (14 із 46), що говорить про більш доцільне використання їх в якості прогностичних.

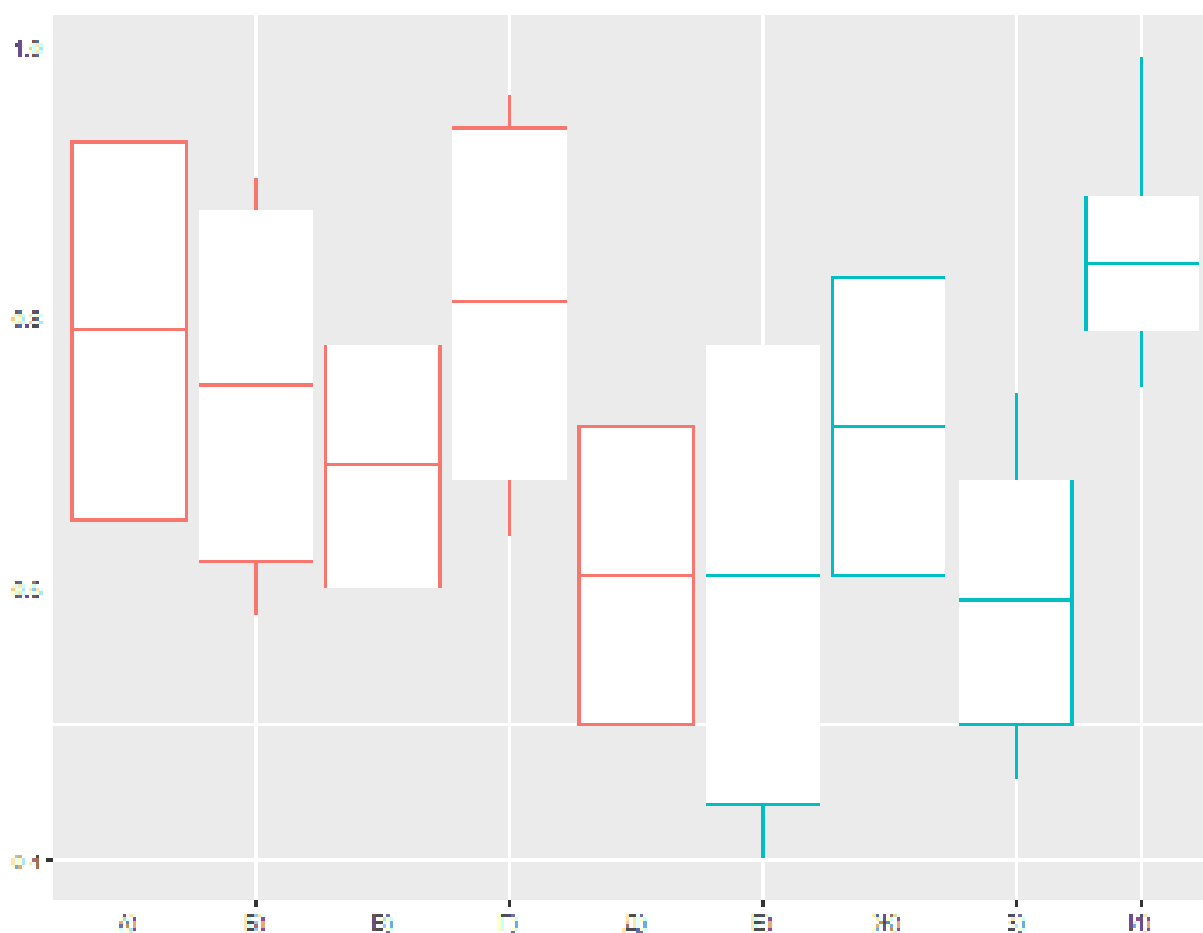


Рисунок 4.7 – Морфометричні показники коефіцієнту круглості ядер клітин ІПК. А – муцинозна ER (+) АК яєчників, Б – муцинозна ER (-) АК яєчників, В - неспецифікована ER (-) АК яєчників, Г - серозна ER (+) АК яєчників, Д - ендометріодна ER (+) АК яєчників; Е – колоректальний рак, Ж - АК верхніх відділів ШКТ, З - мезотеліома, И – нейроендокринна карцинома.

Треба також додати, що за цими двома маркерами СК 7 та СА-125 (-) була негативна тільки 1 недиференційована карцинома (? первинність з яєчника); негативні виключно за СА-125 (-) виявились: 2 ендометріодні, 2 світ-

ло-клітинні, 1 недиференційована карцинома та 4 низькодиференційовані АКЯ; негативні лише за СК 7 (-): 2 муцинозні АКЯ та 1 низькодиференційована АКЯ; разом це склало 28,26 % (13 з 46). Вважати їх первинними карциномами яєчників дозволило повне клінічне обстеження.

Особливості будови різних первинних АКЯ знайшли своє відображення в різних розмірах їх МФМ показників в програмі ImageJ (табл. 4.2). Таблиця 4.2 розбиває варіанти АКЯ за зменшенням ядер клітин від муцинозної до світлоклітинної АК; найменш круглими виявились ядра ендометріюїдної карциноми.

Таблиця 4.2 – Показники морфометричного дослідження ядер клітин зразків первинних пухлин яєчників в програмі ImageJ, n, $M \pm SD$, μm^2 , μm

Типи первинних пухлин яєчників	Площа я/к (μm^2)	Периметр я/к (μm)	Коефіцієнт круглості я/к
Муцинозна АК, (n=3)	74,29±19,59	33,48±4,06	0,85±0,12
Ендометріюїдна АК, (n=4)	31,50±5,48	22,85±2,27	0,59±0,12
Серозна АК, (n=24)	28,91±8,09	21,26±2,56	0,68±0,14
Низькодиференційована АК, (n=13)	22,75±4,77	18,96±1,93	0,67±0,09
Світлоклітинна АК, (n=2)	20,17±3,38	18,39±2,12	0,63±0,10

Примітка. n – кількість пухлин, $M \pm SD$ – середнє значення \pm стандартне відхилення, я/к – ядер клітин, АК – аденокарцинома.

Порівняння МФМ показників верифікованих імунофенотипів ІПК, що походили вірогідно з яєчників (муцинозна ER (+) АК, муцинозна ER (-) АК, серозна ER (+) АК, ендометріюїдна ER (+) АК) з відповідними первинними АКЯ занесені в таблицю 4.3. Достовірну різницю було знайдено тільки за параметром «площа» між муцинозною ER (-) АКЯ, як фенотипом ІПК та первинною муцинозною АКЯ ($p < 0,05$) й відповідними серозними АК ($p < 0,05$). Такі результати можна пояснити в першому випадку наявністю в первинних муцинозних АКЯ більше клітин із функцією слизоутворення, що накопичуючи муцин, мають достатньо великі розміри. Серед серозних АК з канцероматозом були представники виключно «high-grade» серозних фенотипів із позитивним онкомаркером p53 (доведення шляху канцерогенезу, агресивний ва-

ріант), в той час як в серозних фенотипах первинних АКЯ частково були представлені спостереження серозних «low-grade» p53 (-) АК, які достовірно мали менші клітини. Це знайшло відображення в зменшенні середніх значень площ для всієї вибірки первинних серозних АКЯ.

Таблиця 4.3 – Порівняння показників морфометричного дослідження ядер клітин зразків папілярних канцероматозів, що вірогідно походили з яєчників та первинних пухлин яєчників в програмі ImageJ, n, M±SD, мкм², мкм

Типи пухлин порівняння	Площа я/к (мкм ²)	p	Периметр я/к (мкм)	p	Коефіцієнт круглості я/к	p
Муциозна ER (+) АКЯ, як фенотип ІПК, (n=1)	70,70± 17,3	p ^{&} >0,05	32,20± 3,6	p ^{&} >0,05	0,79± 0,14	p [*] >0,05
Первинна муциозна АКЯ, (n=3)	74,29± 19,59		33,48± 4,06		0,85± 0,12	
Муциозна ER (-) АКЯ, як фенотип ІПК, (n=4)	66,70± 4,0	p ^{&} <0,05	30,23± 1,9	p ^{&} >0,05	0,75± 0,13	p [*] >0,05
Первинна муциозна АКЯ, (n=3)	74,29± 19,59		33,48± 4,06		0,85± 0,12	
Ендометріодна АКЯ, як фенотип ІПК, (n=2)	32,40± 5,1	p ^{&} >0,05	24,70± 2,2	p ^{&} >0,05	0,61± 0,11	p [*] >0,05
Первинна ендометріодна АКЯ, (n=4)	31,50± 5,48		22,85± 2,27		0,59± 0,12	
Серозна АКЯ, як фенотип ІПК, (n=5)	36,10± 8,15	p ^{&} <0,05	22,40± 2,50	p ^{&} >0,05	0,81± 0,13	p [*] >0,05
Первинна серозна АКЯ, (n=24)	28,91± 8,09		21,26± 2,56		0,68± 0,14	

Примітка. n – кількість пухлин, M±SD – середнє значення ± стандартне відхилення, я/к – ядра клітин, * - дані груп порівняні t-критерієм Стьюдента, & - дані груп порівняні U-критерієм Манна-Уїтні, АКЯ – аденокарцинома яєчників, ІПК – ізольований папілярний канцероматоз, ER – естрогенові рецептори.

Резюме. Спостереження ІПК у жінок на етапі другого кроку ІГХ розподілились на СА-125-(+) карциноми 15 із 24 (62,5 %), що вірогідно були пов'язані з яєчником та СА-125(-) з інших джерел. Більшість СА-125-(+) випадків ІПК відповідали серозній ER (+) АКЯ – 5 із 15 (33,33 %) з імунофено-

типом [СК 7 (+), СА-125 (+), СК 20 (-), ER (+), Vimentin (-), WT-1 (+), PAX-8 (+), Calretinin (-)], який за МФМ показником площі мав вірогідно крупніші ядра клітин ($p < 0,05$), порівняно з первинними серозними АКЯ.

Друге місце серед ІПК поділили між собою фенотип [СА-125 (+), СК 7 (+), СК 20 (-), ER (-), Vimentin (-), WT-1(-), PAX-8 (-), Calretinin (-)]: АК вірогідно з яєчника, з огляду на те, що ER (-), а маркер СА-125 зустрічається в муцин-продукуючих карциномах інших органів, та сумнівні для яєчника комбінації маркерів: [СА-125 (-), СК 7 (+), СК 20 (+/-), WT-1 (-), ER (-), CDX-2 (+/-), PAX-8 (-), Calretinin (-)], вірогідно з верхніх відділів ШКТ, прогноз лікування таких ІПК менш передбачуваний через подібність імунофенотипів гастро-дуоденальних та панкреато-біліарних АК, без клінічних даних їх можна віднести до 3 категорії «підтвержені РНПЛ».

Отримуємо, що тільки 2/3 випадків ІПК без первинної локалізації у жінок після другої панелі ІГХ теоретично можна віднести до метастазів з яєчника із застосування відповідної терапії, приблизно 1/3 випадків має інше походження. Остаточна верифікація ІПК потребує розширеної ІГХ панелі: [СА-125, СК 7, СК 20, ER, WT-1, PAX-8, CDX-2, Calretinin] з урахуванням МФМ показників ядер клітин в сумнівних фенотипах.

4.1.2 Дослідження інтраепітеліальної неоплазії епітелію маткової труби, як можливого джерела походження ізолюваного папілярного канцероматозу з фенотипом серозної «high-grade» аденокарциноми яєчника

Для підтвердження або спростування гіпотези про одне джерело походження «high-grade» АКЯ та серозного ІПК, в якості фенотипу РНПЛ, з епітелію маткової труби було сформовано 3 групи дослідження. Група 1 - зразки фаллопієвих труб (без непластичних трансформацій (1а, n=8) з змінами епітелію у вигляді інтраепітеліальної неоплазії II-III (1б, n=6); група 2 – серозні

АКЯ (n=13); група 3 – ІПК з ознаками серозної АК (n=5). МФМ дослідження інформативних полів зору в програмі ImageJ занесені в таблицю 4.4.

Аналізуючи МФМ показники досліджених груп, чітко простежується тенденція збільшення ядер клітин «зверху вниз» від епітелію маткової труби без атипії до ІПК, подібного до «high-grade» АКЯ. Але статистично достовірну різницю було знайдено лише в показниках площі між ІПК (група 3) і всіма першими трьома підгрупами (1а, 1б, 2), що говорить про подібність яєчникових та трубних неоплазій з епітелієм маткової труби (табл. 4.4). Результати ІГХ показали, що експресія діагностичних СК 7 та СК 20 виявилась для всіх груп однорідною: СК 7 (+ або +/-) але СК 20 строго (-) (рис. 4.8).

Таблиця 4.4 - Показники морфометричного дослідження ядер клітин спостережень епітелію маткових труб, серозних аденокарцином яєчника та серозних папілярних канцероматозів в програмі ImageJ, n, M±SD, мкм², мкм

Група дослідження	Площа я/к (мкм ²)	Периметр я/к (мкм)	Коефіцієнт Круглості я/к
Група (1а) Епітелій маткової труби без атипії, (n=8)	24,5±4,8	19,2±2,1	0,71±0,15
Група (1б) Трубна інтраепітеліальна неоплазія, (n=6)	25,9±6,7	19,6±2,6	0,69±0,09
Група (2) Серозна «high-grade» АК яєчника, (n=13)	28,9±8,1	21,2±2,5	0,68±0,14
Група (3) ІПК серозного фенотипу [СА-125+, СК 7+, СК 20-, WT-1+, PAX-8+, p53+], (n=5)	36,1±8,15	22,4±2,5	0,81±0,13
p*	p(1а, 1б) ^{&} >0,05, p(1а, 2) [*] >0,05, p(1а, 3)^{&}<0,05, p(1б, 2) ^{&} >0,05, p(1б, 3)^{&}<0,05, p(2, 3)^{&}<0,05	p(1а,1б) ^{&} >0,05, p(1а, 2) [*] >0,05, p(1а, 3) ^{&} >0,05, p(1б, 2) ^{&} >0,05, p(1б, 3) ^{&} >0,05, p(2, 3) ^{&} >0,05	p(1а,1б) ^{&} >0,05, p(1а, 2) [*] >0,05, p(1а, 3) ^{&} >0,05, p(1б, 2) ^{&} >0,05, p(1б, 3) ^{&} >0,05, p(2, 3) [*] >0,05

Примітка. n – кількість пухлин, M±SD – середнє значення ± стандартне відхилення, я/к – ядра клітин, * - дані груп порівняні t-критерієм Стьюдента, & - дані груп порівняні U-критерієм Манна-Уїтні, АКЯ – аденокарцинома яєчників, ІПК – ізольований папілярний канцероматоз, ER – естрогенові рецептори.

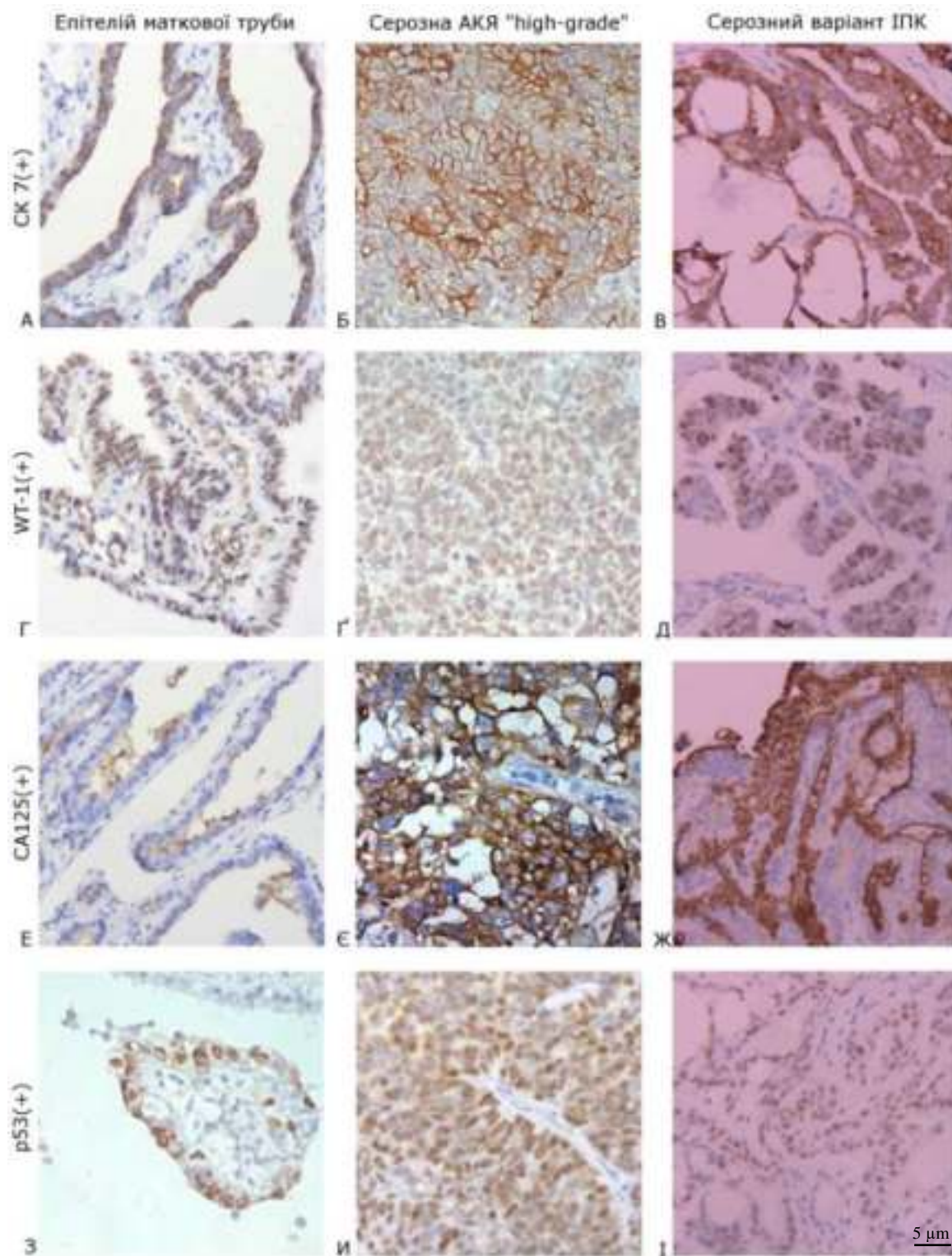


Рисунок 4.8 - Епітелій маткової труби з ознаками інтраепітеліальної неоплазії (А, Г, Е, З). Серозна «high-grade» АКЯ (Б, Г, Є, И). ІПК (В, Д, Ж, І).

А – В. Цитоплазматична реакція СК 7 (+). Г – Д. Інтрануклеарна експресія WT-1 (+). Е – Ж. Мембранна експресія СА-125 (+). З – І. Інтрануклеарна експресія p53 (+). ІГХ з додатковим забарвленням гематоксилином Майєра. Зб.: ×400.

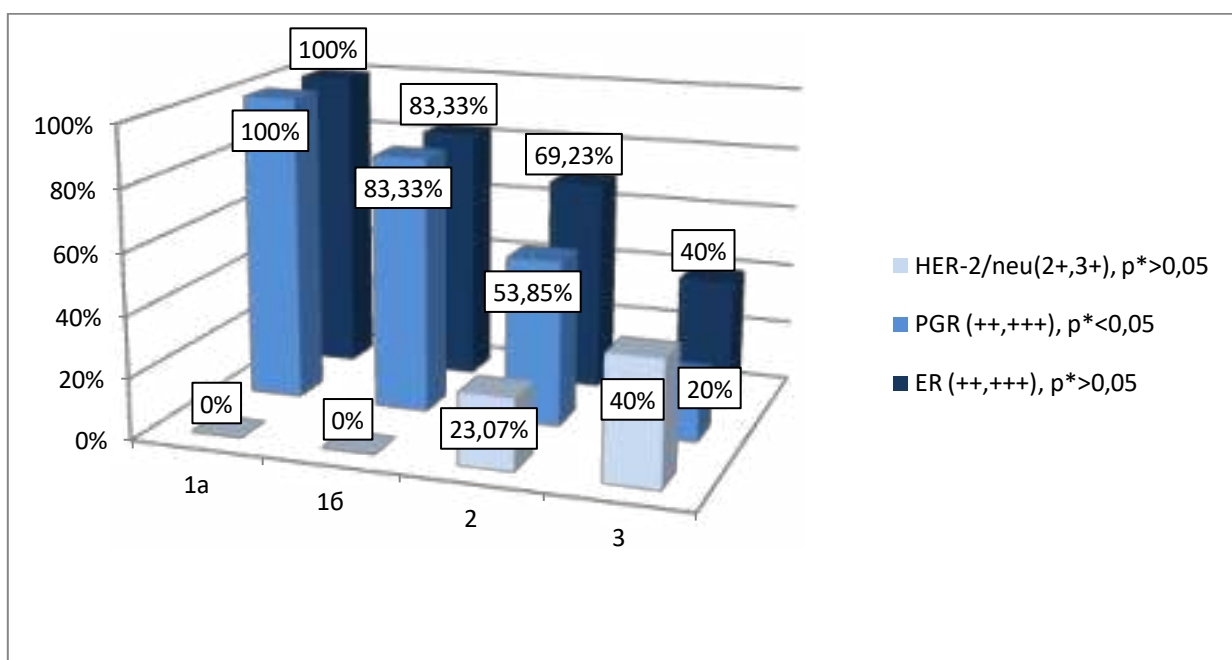
Стосовно маркеру серозних АКЯ WT-1, треба відмітити, що його позитивний статус був вибраний критерієм для набору випадків в групі 2 і 3, і тому ретельно досліджувався в підгрупах 1а і б, як вірогідних джерел походження (рис. 4.8). Мала місце різниця експресії WT-1 дистальних та проксимальних ділянок труб за критерієм Стьдента з перевагою відсотку позитивних інтрануклеарних реакцій в дистальних відділах ($68,7 \pm 8,12\%$ проти $36,8 \pm 7,81\%$, $p < 0,05$). Треба відмітити, що 37,5 % труб (3 із 8) підгрупи 1а та 33,33 % зразків труб (2 із 6) підгрупи 1б мали негативні WT-1 реакції в дистальних та проксимальних фрагментах. Діагностичний муцин 16 типу, що відомий як СА-125 і притаманний АКЯ, мав також неоднорідний характер мембранного забарвлення в підгрупах 1а і 1б фрагментів маткових труб із зниженням кількості забарвлених клітин в проксимальних фрагментах, інколи до повного зникнення (3 випадки), та в групі 3 – ІПК – фрагментарне мембранне забарвлення папілярних структур, але в групі 2 АКЯ експресія СА-125 носила стійкий (+) характер (рис. 4.8).

Також в роботі був досліджений прогностичний маркер p53, що визначався для отримання даних про мутацію гену TP53 через наявність аберантної експресії (вище 60 % - надекспресія, або нижче 5 % - відсутність експресії) і розглядався як шлях канцерогенезу серозних пухлин «high-grade» типу (рис. 4.8). За норму брали показники експресії p53 спостережень маткових труб підгрупи 1а (без атипії), що коливались в межах $7,04 \pm 1,26$ серед їх проксимальних та дистальних фрагментів.

Експресія p53 в підгрупі 1б (інтраепітеліальна неоплазія маткової труби) виявилась в двох варіантах – негативні зразки 4 з 6 (66,67 %) (<5 % забарвлених клітин), та з надекспресією в 2 з 6 (33,33 %), коливання в межах $67,78 \pm 13,51$, з кількісною перевагою в дистальних фрагментах (фімбріях). Експресія p53 в групі 2 серед серозних АКЯ мала також розподіл на негативні зразки: 6 із 13 (46,15 %) та зразки з надекспресією 7 із 13 (53,84 %), коливання показників в межах $73,24 \pm 8,93$. Експресія p53 в групі 3 серед ІПК відповідно продемонструвала негативні зразки: 3 із 5 (60,00 %) та зразки з наде-

кспресією 2 із 5 (40,00 %), де коливання показників були в межах $65,93 \pm 4,74$. Статистично вірогідної різниці варіантів експресії p53 точним тестом Фішера в групах 1б, 2 і 3 знайдено не було ($p > 0,05$).

Характеристики гормональних статусів (кількість естрогенових (ER) та прогестеронових (PGR) рецепторів за шкалою McCarty (1985) [25], в групах дослідження представлена на діаграмі рисунку 4.9. Видно, що експресія ER та PGR прогресивно зменшувалась від підгруп 1а й 1б в бік групи 3, з падінням ER (-/+) до 60% (3 з 5) та PGR (-/+) аж до 80% (4 з 5) в групі ІПК (рис. 4.9). Звичайно це ускладнювало діагностику ІПК без відомого джерела. Дані груп були порівняні точним тестом Фішера, знайдена достовірна різниця експресії тільки для PGR ($p < 0,05$).



Примітка. * - дані груп порівняні точним тестом Фішера.

Рисунок 4.9 – Порівняння гормонального статусу (естрогенові рецептори – ER, прогестеронові рецептори – PGR) та статусу за епідермальним фактором росту HER-2/neu епітелію МТ без атипії (1а) та з ознаками трубної інтраепітеліальної неоплазії (1б), серозної аденокарциноми яєчника варіанту «high-grade» (2) та ізольованого папілярного канцероматозу (3), %.

Аналіз ІГХ експресії епідермального фактору росту HER-2/neu, що також був представлений на рис. 4.9, показав відсутність HER-2/neu у підгрупах 1а і 1б. В групі 2 серед АКЯ позитивні ІГХ реакції з HER-2/neu в 3

з 13 випадків (23,07 %) показали рівень до 2+/3+. В групі 3 серед ІПК серозного «high-grade» варіанту ми отримали 2 з 5 (40,00 %) позитивних HER-2/neu 2+/3+ спостереження, тобто це приблизно вдвічі більше, порівняно з серозними АКЯ «high-grade» варіанту з групи 2. Але за точним тестом Фішера достовірна різниця знайдена не була ($p > 0,05$).

Резюме. Таким чином, імунофенотипи груп дослідження (зразків фаллопієвих труб без та з ознаками інтраепітеліальної неоплазії, серозної АКЯ варіанту «high-grade» та ізольованого папілярного канцероматозу серозного типу «high-grade» варіанту) виявили однорідність в експресії маркерів [СК 7 (+, +/-), СК 20 (-), WT-1 (+), СА-125 (+, +/-)], з більшою подібністю імунофенотипу [СК 7 (+), WT-1 (+), СА-125 (+)] неопластичних процесів до дистальних фрагментів маткових труб (ділянок фімбрій).

Експресія p53 в усіх групах з ознаками карцином (порівняно із контрольною підгрупою 1a МТ без атипії) виявилась в двох варіантах – негативні зразки (група 1б мала 66,67 %, група 2 - 46,15 %, група 3 - 60,00 %) та зразки з надекспресією (33,33 %; 53,84 %; 40,00 % відповідно), де точним тестом Фішера в групах дослідження статистично вірогідної різниці знайдено не було ($p > 0,05$), вірогідно це є відображенням одного послідовного шляху канцерогенезу.

МФМ показники виявили тенденцію поступового збільшення ядер клітин з накопиченням атипії – від епітелію маткової труби без дисплазії до метастатичного папілярного канцероматозу. Статистично достовірна різниця виявилась в показниках «площа» між всіма першими трьома підгрупами (1a, 1б, 2) та групою 3 (всі $p < 0,05$), вірогідно через подібність трубних та яєчникових неопластичних процесів до епітелію маткової труби.

ІГХ експресія стероїдних гормонів ER та PGR втрачалась пропорційно агресивності пухлин – від підгрупи 1a до групи 3, із набуттям ER (-/+) до 60% та PGR (-/+) до 80% карцином в групі ІПК, що значно ускладнює діагностичний пошук для карцином невідомої первинної локалізації. За точним тестом Фішера знайдена достовірна різниця експресії тільки для PGR ($p < 0,05$), для

ER ($p > 0,05$). ПХ експресія HER-2/neu в градаціях 2+/3+ не зустрічалась в зразках маткових труб, а визначилась в АКЯ «high-grade» типу на рівні 23,07 % та в групі серозних ППК на рівні 40,00 %. За точним тестом Фішера достовірна різниця експресії HER-2/neu знайдена не була ($p > 0,05$).

4.2 Жінки з метастазами карциноми в ізольовані аксиллярні лімфатичні вузли

29 спостережень «попередніх РНПЛ» були отримані шляхом пункційної біопсії у жінок із збільшенням однобічних аксиллярних лімфатичних вузлів (АЛВ) без виявлених ділянок первинного пухлинного росту (в першу чергу, в молочних залозах (МЗ) після мамографії). Наступним кроком, вони перевірялись на відповідність «епітеліальній» морфології та імунофенотипу епітеліальних пухлин після первинної панелі маркерів: [Pan CK AE1/3 (+), Vimentin (-/+), CD45 (-), S100 (-) і/або HMB45 (-)]. Таким чином, була сформована однорідна за локалізацією ураження сукупність РНПЛ метастатичних карцином для порівняння з первинними місцево-розповсюдженими карциномами МЗ у жінок.

4.2.1 Розподіл фенотипів і порівняння морфометричних показників метастатичних карцином в аксиллярні лімфатичні вузли та первинних пухлин молочної залози

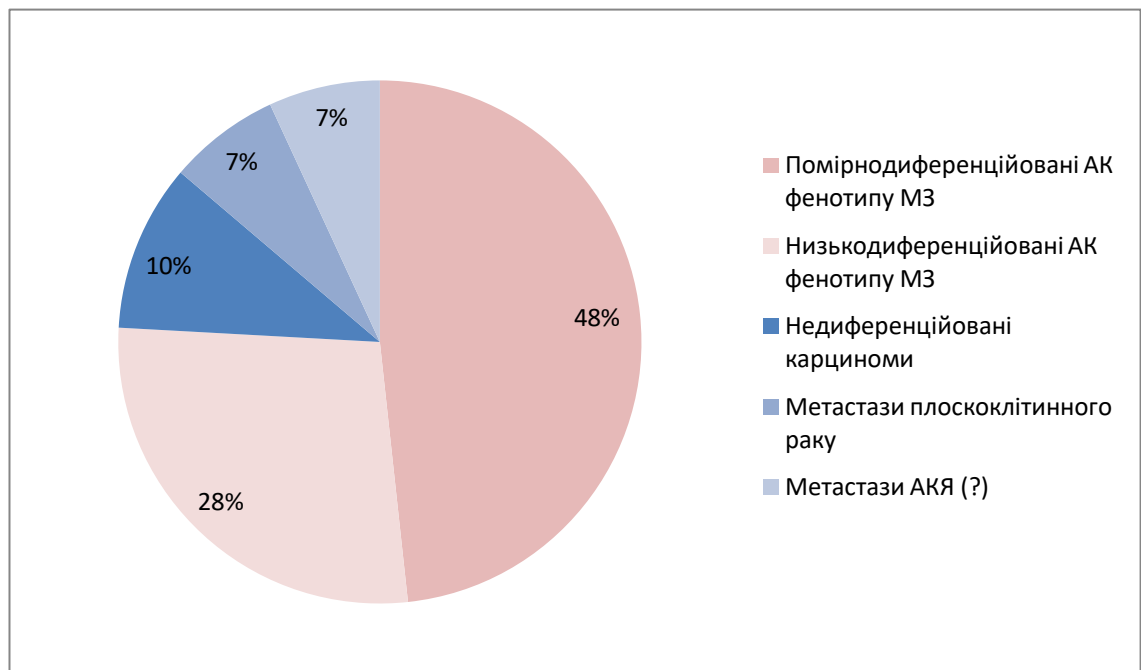
Аналіз розподілу фенотипів метастатичних карцином групи 1 у жінок показав значну перевагу АК з фенотипами пухлин МЗ – 75,86 % (22 із 29) – [CK 7 (+), CK 20 (-), ER (+/-), PGR (+/-), CA-125 (+), PAX-8 (+), HER-2/neu (+/-)], 14 з яких (63,6 %) припало на помірnodиференційовані протокові АК, а 8 (36,4 %) виявились АК низького ступеня диференціації (рис. 4.10). З цих спостережень була сформована група 1 (середній вік $66,23 \pm 11,09$ років) для подальшого порівняння з первинним АК МЗ. Інші 7 зразків, що мали вірогідні фенотипи метастазів не з МЗ, були представлені:

6,89 % (2 із 29) ПР (середній вік $61,52 \pm 14,42$ років): [СК 7 (+), СК HMW (+), ER (-), PGR (-), HER-2/neu (-)] – вірогідно з легенів, зважаючи на СК 7 (+);

6,89 % (2 із 29) вірогідно АК яєчників або ендометрію (середній вік $61,52 \pm 14,42$ років): [Pan СК AE1/3 (+), Vimentin (+,-), СК 20 (-), СК 7 (+), ER (+/-), CA-125 (+), PAX-8 (+), PGR (+/-), HER-2/neu (-)];

10,34 % (3 із 29) НДР з сумнівними фенотипами, можливо з верхніх відділів ШКТ (середній вік $61,52 \pm 14,42$ років): [Pan СК AE1/3 (+), Vimentin (+,-), СК 20 (+,-), СК 7 (+,-), ER (-), PGR (-), PAX-8 (-), HER-2/neu (-)].

В свою чергу первинні АК МЗ (група 2) були представлені на 25,0 % (12 з 48) високодиференційованими АК, на 54,16 % (26 з 48) помірно-диференційованими АК (інфультруючі протокові АК) та на 20,8 % (10 з 48) АК низького ступеня диференціювання.



Примітка. АК – аденокарцинома, МЗ – молочна залоза, АКЯ – аденокарцинома яєчника.

Рисунок 4.10 – Розподіл фенотипів метастатичних карцином з ураженням ізольованих однобічних аксиллярних лімфатичних вузлів у жінок, %.

Дослідження вікових діапазонів групи 1 метастазів в АЛВ у жінок з фенотипами МЗ та групи 2 первинних карцином МЗ ($66,23 \pm 11,09$ років проти

55,43±12,19 років відповідно) t-критерієм Стьюдента показало достовірну різницю ($p < 0,05$).

Порівняння ІГХ профілю карцином групи 1 та 2 визначило найбільш специфічними маркерами Pan CK AE1/3 і CK 7 (100 % реакцій), а також маркер рецепторів до естрогену, що був позитивним у 81,82 % (18 із 22) при метастатичних АК та в 79,17 % (38 із 48) при первинних АК.

Рецептори до прогестерону експресувались в значно меншій кількості: в метастатичних АК – 11 із 22 (50 %) та в первинних АК – 31 із 48 (64,58 %), як і HER-2/neu: в метастатичних АК – 11 із 22 (50 %) та в первинних АК – 31 із 48 (64,58 %) відповідно (рис. 4.11).

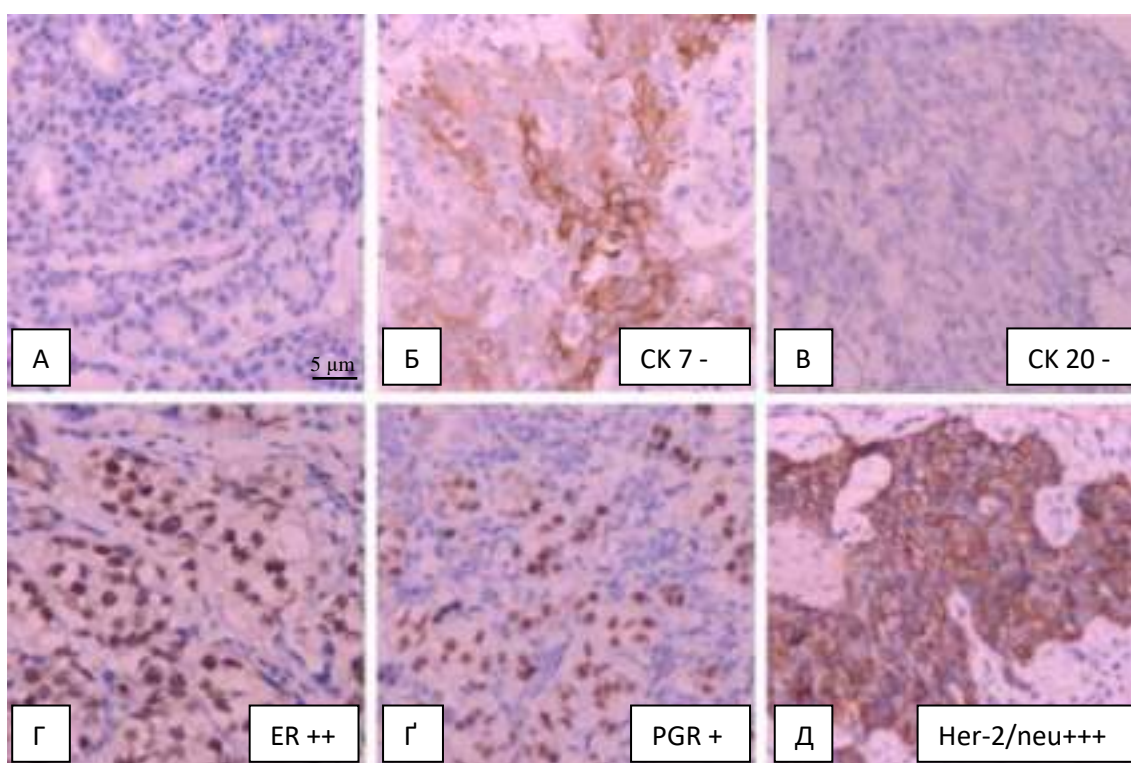


Рисунок 4.11 – Метастаз АК в ізолюваний АЛВ з фенотипом МЗ. А. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Б. Позитивна реакція з СК 7. В. Негативна реакція з СК 20. Г. Інтрануклеарна експресія ER. Ґ. Інтрануклеарна експресія PGR. Д. Мембранна експресія HER-2/neu (+++). Б – Д. ІГХ метод з гематоксиліном Майєра. Зб.: ×400.

«Три-негативні» спостереження карцином [ER (-), PGR (-), HER-2/neu (-)] склали 16,67 % первинних АК і всього 4,54 % метастатичних АК. Це пов'язано насамперед з складною верифікацією такого фенотипу «попередніх

РНПЛ» без експресії гормонів, і, таким чином, три-негативні метастази з МЗ могли бути помилково віднесені до НДР будь-якої іншої локалізації.

Подібність гістологічної будови метастатичних карцином з фенотипом АК МЗ з групи 1 та первинних АК молочної залози знайшла своє відображення в подібності МФМ показників периметру та коефіцієнту круглості за ($p > 0,05$). Але ядра клітин метастатичних АК були достовірно меншими ($p < 0,05$) і трохи овальнішими, через що набували анапластичного вигляду (табл. 4.5).

Таблиця 4.5 - Показники морфометричного дослідження ядер клітин спостережень первинних та метастатичних аденокарцином молочної залози у програмі ImageJ, n, $M \pm SD$, $\mu\text{км}^2$, $\mu\text{км}$

Група карцином	Площа я/к ($\mu\text{км}^2$)	Периметр я/к ($\mu\text{км}$)	Коефіцієнт круглості я/к
Ураження АЛВ у жінок з фенотипами молочної залози (група 1), (n=22)	30,9±11,0	22,2±3,9	0,64±0,13
Первинні АК молочної залози (група 2), (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, $M \pm SD$ – середнє значення \pm стандартне відхилення, я/к – ядер клітин, * - дані груп порівняні t-критерієм Стьюдента, & - дані груп порівняні U-критерієм Манна-Уїтні, АЛВ – аксиллярні лімфатичні вузли, АК – аденокарцинома.

4.2.2 Розподіл фенотипів метастатичних та первинних карцином молочної залози за комбінаціями прогностичних маркерів «золотого стандарту» [ER, PGR, HER-2/neu]

Розподіл за комбінаціями прогностичних маркерів «золотого стандарту» діагностики раку молочних залоз, а саме рецепторів до естрогенів ER, рецепторів до прогестеронів PGR та епідермального фактору росту HER-2/neu в метастатичних та первинних АК МЗ виявив наявність шести можливих варіацій з значною перевагою позитивного на гормони і негативного за епідермальним фактором росту фенотипу [ER (+), PGR (+), HER-2/neu (-)] в

обох групах. Згідно точного тесту Фішера знайдена статистично достовірна різниця між групами ($p < 0,05$) (табл. 4.6).

Таблиця 4.6 - Розподіл фенотипів метастазів аксилярних лімфатичних вузлів з фенотипами карцином молочної залози та первинних карцином молочної залози за комбінацією маркерів [ER, PGR, HER-2/neu], n (%)

Тип комбінації прогностичних маркерів	Метастази АЛВ у жінок з фенотипами карцином МЗ, n (%)	Первинні карциноми молочної залози, n (%)	p
ER+/ PGR+/ HER-2/neu+	3 (13,64)	2 (4,17)	$p^* < 0,05$
ER+/ PGR+/ HER-2/neu-	8 (36,36)	29 (60,42)	
ER+/ PGR-/ HER-2/neu+	3 (13,64)	1 (2,08)	
ER+/ PGR-/ HER-2/neu-	4 (18,18)	6 (12,50)	
ER-/ PGR-/ HER-2/neu+	3 (13,64)	2 (4,17)	
ER-/ PGR-/ HER-2/neu-	1 (4,55)	8 (16,67)	
Всього:	22	48	

Примітка. n – кількість пухлин, * - групи порівняні точним тестом Фішера, АЛВ – аксилярні лімфатичні вузли, МЗ – молочна залоза.

Резюме. Перевірка спостережень синдрому «РНПЛ» з фенотипом ураження ізольованих однобічних АЛВ у жінок визначило перевагу комбінації маркерів [Pan CK AE1/3 (+), CK 7 (+), ER (+), PGR (+), CA-125 (-), PAX-8 (-), HER-2/neu (+/-)], що відповідає метастатичним АК МЗ. Морфологічна будова і значення показників «периметр» і «коефіцієнт круглості» ядер були дуже подібні в групах метастазів АЛВ у жінок з фенотипами карцином МЗ та первинних карцином МЗ (обидва $p > 0,05$), але показник «площа» метастатичних карцином був достовірно меншим ($p < 0,05$) за первинні карциноми МЗ. Також статистично достовірно за точним критерієм Фішера відрізнявся розподіл спостережень карцином груп спостережень за комбінацією прогностичних маркерів ER, PGR, HER-2/neu ($p < 0,05$).

Жінки із ураженням ізольованих однобічних аксилярних лімфатичних вузлів карциномою з фенотипом молочної залози, в середньому, на п'ять років старші, ніж жінки з первинною пухлиною молочної залози ($66,23 \pm 11,09$

років проти $55,43 \pm 12,19$ років), порівняння t-критерієм Стьюдента показало достовірну різницю ($p < 0,05$).

Зниження ступеня диференціювання в обох групах карцином МЗ характеризувалось збільшенням [ER (-), PGR (-), HER-2/neu (-)] фенотипів, так званих «три-негативних» варіантів, що з огляду на високі відсотки низькодиференційованих АК і недиференційованих раків серед спостережень метастазів «попередніх РНПЛ» цього фенотипу (28 % і 10 % відповідно) потребує використання високоспецифічних маркерів діагностики карцином МЗ (GATA3, SOX10, MGB) та маркерів виключення (CA-125, CK 20, CDX-2, PAX-8 та ін.).

4.3 Чоловіки з метастазами аденокарциноми кісток і підвищеним показником сироваткового PSA

Усі відібрані спостереження метастазів АК в кістки ($n_1=10$; середній вік $50,00 \pm 9,89$ років) та первинних карцином передміхурової залози (ПЗ) ($n_2=21$; середній вік $66,00 \pm 7,76$ років) були проаналізовані за патернами гістологічної будови на відповідність «епітеліальній» морфології та фенотипу карциноми [Pan CK AE1/3 (+), Vimentin (-), CD45 (-), S100 (-) і/або HMB45 (-)] первинної ланки діагностичної панелі ІГХ маркерів. Порівняння вікових діапазонів цих груп ($50,00 \pm 9,89$ проти $66,00 \pm 7,76$ років) t-критерієм Стьюдента показало достовірну різницю ($p < 0,05$).

Патогістологічне дослідження ступенів диференціювання метастазів карцином в кістки у чоловіків із підвищенням в крові загального 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 %) – недиференційованим раком (рис. 4.12), за точним тестом Фішера знайдено достовірну різницю ($p < 0,05$).

Показники МФМ дослідження в програмі ImageJ показали статистично достовірне зменшення показників «площа» та «периметр» для ядер клітин групи 2 (обидва $p < 0,05$ відповідно), що є відображенням втрати диференціювання (анапластична зовнішність через значний поліморфізм та атипію ядер) (табл. 4.7).

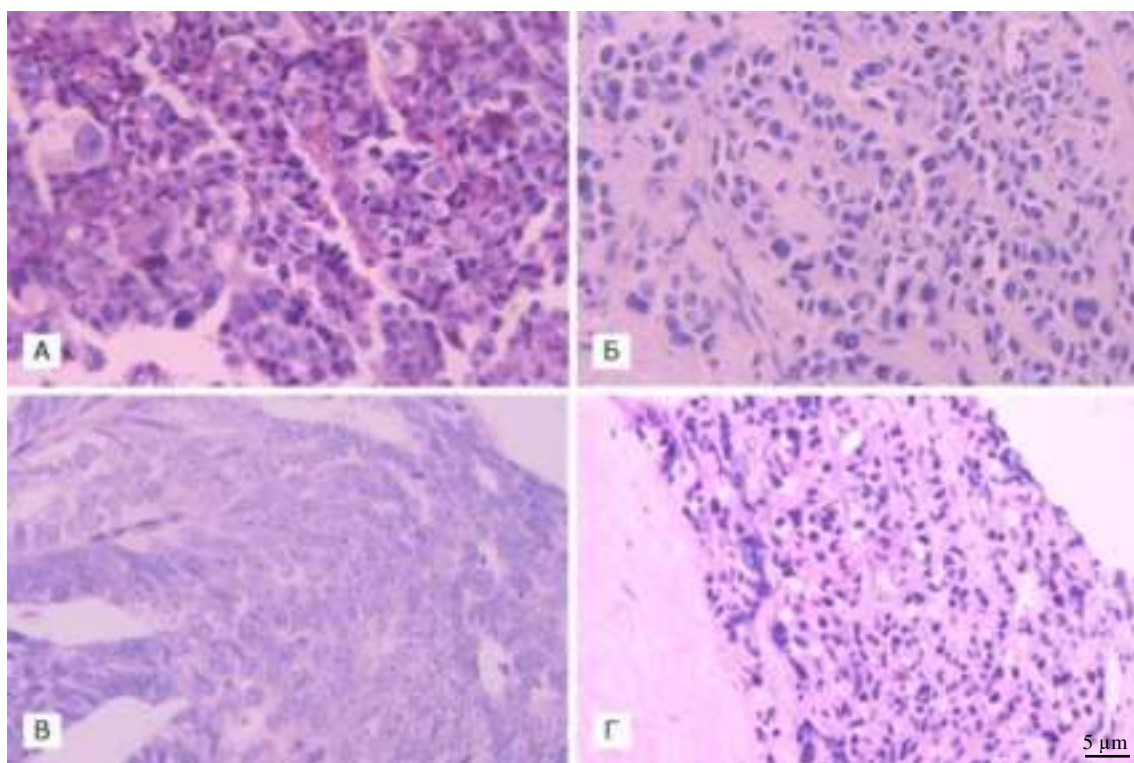


Рисунок 4.12 – Варіанти диференціювання первинних АК ПЗ (помірно, низькодиференційована АК та НДР відповідно (А – В)). Г. Анонімний метастаз дрібноклітинної АК в кістки з підвищенням рівня сироваткового PSA. Забарвлення гематоксилином і еозином. Зб.: $\times 400$.

Аналіз вторинної панелі ІГХ первинних карцином ПЗ з'ясував, що найбільш специфічними маркерами для цієї локалізації є СК 8/18, PSA, p504s (AMACR), AR (андрогенові рецептори). Про це говорить їх хоча б часткова позитивна експресія в 21 (100 %) спостереженні (рис. 4.13). Але в експресії інших маркерів були відмінності, а саме: за маркером СК 20 2 із 21 (9,52 %) карциноми продемонстрували нехарактерну позитивну експресію (за морфологією це були 2 низькодиференційовані АК); за маркером СК 7 – 3 з 21 (14,28 %) виявили позитивні патерни забарвлення (1 недиференційований рак, 2 низькодиференційовані АК, що також в одному випадку експресували

цитокератин високої молекулярної маси СК НМВ (+) (плоскі епітелії). В спостереженнях інших місцево-розповсюджених карцином ПЗ високого та помірного ступеня диференціювання ці маркери були негативні, як і маркер базальноклітинного диференціювання рб3.

Таблиця 4.7 - Показники морфометричного дослідження ядер клітин спостережень метастатичних карцином кісток чоловіків з підвищенням сироваткового PSA та первинних аденокарцином передміхурової залози в програмі ImageJ, n, M ± SD, мкм², мкм

Групи дослідження	Площа я/к (мкм ²)	Периметр я/к (мкм)	Коефіцієнт круглості я/к
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	p^{&}<0,05	p*^{<}0,05	p* ^{>} 0,05

Примітка. n – кількість пухлин, M±SD – середнє значення ± стандартне відхилення, я/к – ядра клітин, * - групи порівняні t-критерієм Стьюдента, & - групи порівняні U-критерієм Манна-Уїтні.

У групі метастазів кісток маркери PSA і СК 8 достатньо експресувались в усіх АК, але були частково-позитивними на АМАСР (p504s) - 2 з 10 (20 %) спостереження, а 3 із 10 (30 %) продемонстрували негативний статус за андрогеновими рецепторами AR (-). Вірогідно це пов'язано з анапластичною будовою і зниженням ступеня диференціації, але треба відзначити й складність проведення ІГХ реакцій після декальцинації матеріалу з кісток (рис. 4.14). Через важливе прогностичне значення рецепторів до стероїдних гормонів (андрогенових рецепторів) в обох групах точним тестом Фішера провели їх порівняння за напівкількісною шкалою AR. Отримали достовірну різницю між групами (**p<0,05**) (табл. 4.8).

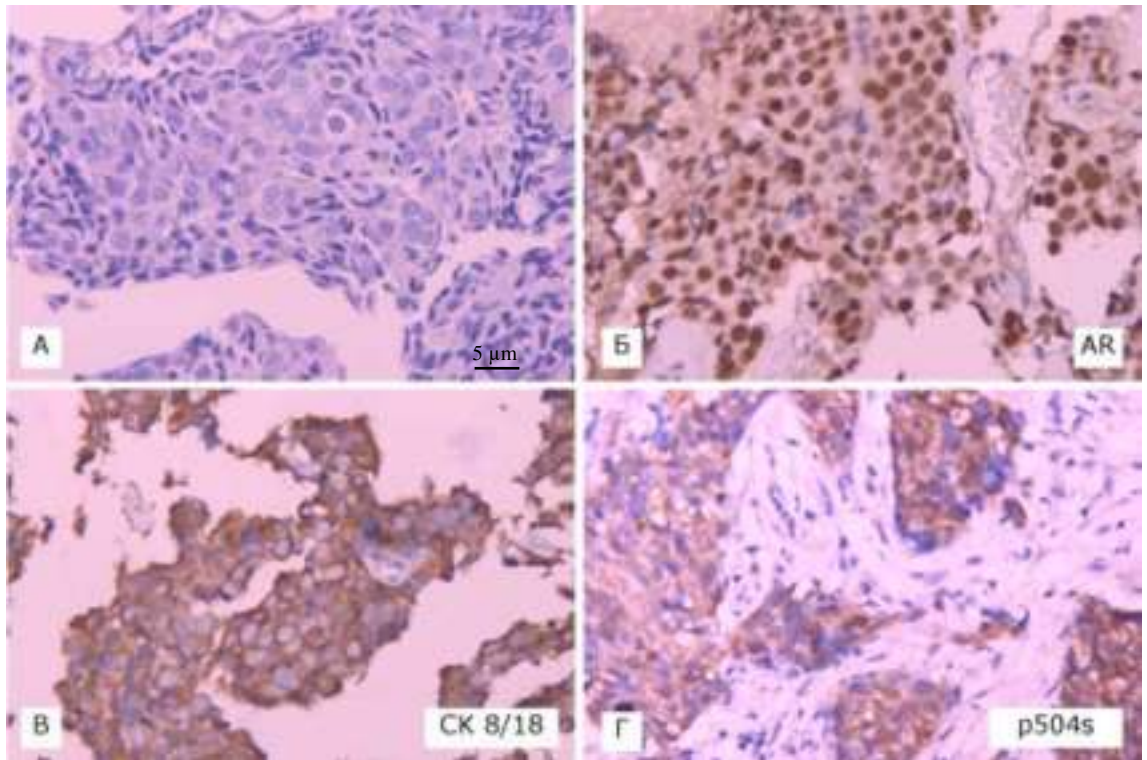


Рисунок 4.13 – Первинна аденокарцинома передміхурової залози. А. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Б. Інтенсивна експресія AR. В. Цитоплазматична реакція з СК 8/18. Г. Цитоплазматична експресія p504s. Б – Г. ІГХ метод з гематоксиліном Майєра. Зб.: $\times 400$.

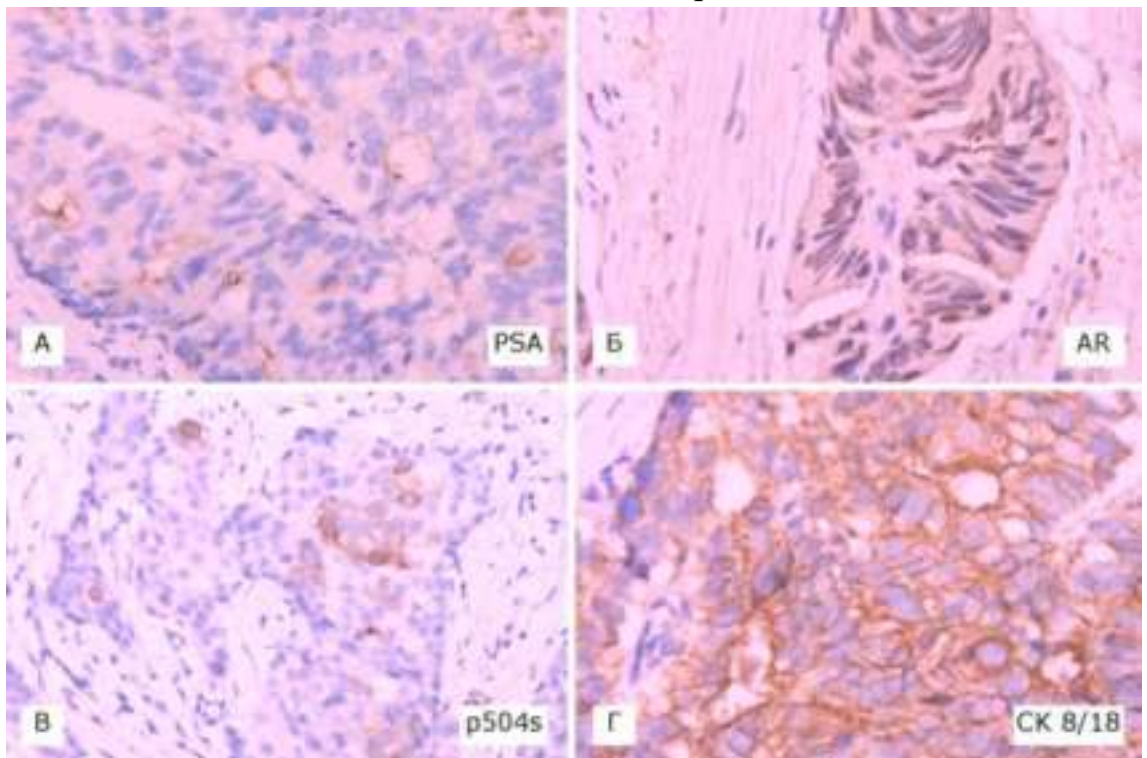


Рисунок 4.14 – Метастаз аденокарциноми в кістки у чоловіка з підвищенням PSA. А. Слабка та локальна експресія PSA. Б. Помірна експресія AR. В. Слабка та локальна експресія p504s. Г. Цитоплазматична експресія з СК 8/18. ІГХ метод з гематоксиліном Майєра. Зб.: $\times 400$.

Таблиця 4.8 – Розподіл спостережень метастатичних карцином кісток чоловіків із підвищенням сироваткового PSA та первинних аденокарцином передміхурової залози за напівкількісною шкалою експресії андрогенових рецепторів, n (%)

Напівкількісна шкала визначення AR	Тип карциноми		p
	Первинні карциноми ПЗ, n (%)	Метастази кісток у чоловіків з підвищенням сироваткового PSA, n (%)	
AR(-)	0 (0)	3 (30,00)	p* < 0,05
AR(+)	5 (23,81)	5 (50,00)	
AR(2+)	12 (57,14)	2 (20,00)	
AR(3+)	4 (19,04)	0 (0)	
Всього:	21 (100)	10 (100)	

Примітка. n - кількість пухлин, * - групи порівняні точним тестом Фішера, ПЗ – передміхурова залоза, AR – андрогенові рецептори.

Резюме. Дослідження фенотипу клініко-морфологічного синдрому «РНПЛ» у чоловіків з бластичними метастазами кісток і підвищенням в крові загального PSA виявило деякі морфологічні, МФМ та ІГХ характеристики, що пов'язані з набуттям дисемінованого агресивного перебігу на відміну від місцево-розповсюджених первинних карцином ПЗ. Порівняння вікових характеристик цих груп ($50,00 \pm 9,89$ років проти $66,00 \pm 7,76$ років) t-критерієм Стьюдента достовірно визначило більш молодий вік в групі метастатичних карцином (**p < 0,05**).

В групі метастазів в кістки можна відзначити перевагу низькодиференційованих гістологічних форм АК (**p < 0,05**), значне зменшення розмірів площ та периметрів ядер клітин (обидва **p < 0,05** відповідно), зниження експресії специфічних для первинних ацинарних карцином ПЗ ІГХ маркерів АМАСР (p504s) та AR (андрогенових рецепторів) (**p < 0,05**).

Використання мінімальних первинної [Pan CK AE1/3 (+), Vimentin (-), CD45 (-), S100 (-) і/або HMB45 (-)] та вторинної [CK 8 (+), PSA (+), АМАСР (p504s) (+), AR (+/-)] ІГХ панелей дасть змогу довести відповідність метастазу карциноми з невідомого первинного джерела у чоловіків із ураженням кіс-

ток і підвищенням в крові загального PSA формі дисемінованої первинної карциноми ПЗ.

4.4 Аденокарцинома з профілем товстої кишки.

Для «попередніх РНПЛ» колоректального профілю були відібрані спостереження метастазів АК колоректального фенотипу ($n_1=37$; середній вік $58,46 \pm 12,28$ років) з різних ділянок після ІГХ дослідження [Pan СК AE1/3 (+), Vimentin (-), CD45 (-), S100 і/або HMB45 (-), СК 20 (+), СК 7 (-), CDX-2 (+)], за умови негативної колонобіопсії (відсутність первинного джерела (рис. 4.15). Для порівняння була сформована група 2 ($n_2=41$; середній вік $60,56 \pm 12,81$ років) місцево-розповсюджених КРР з післяопераційного матеріалу резекції товстої кишки.

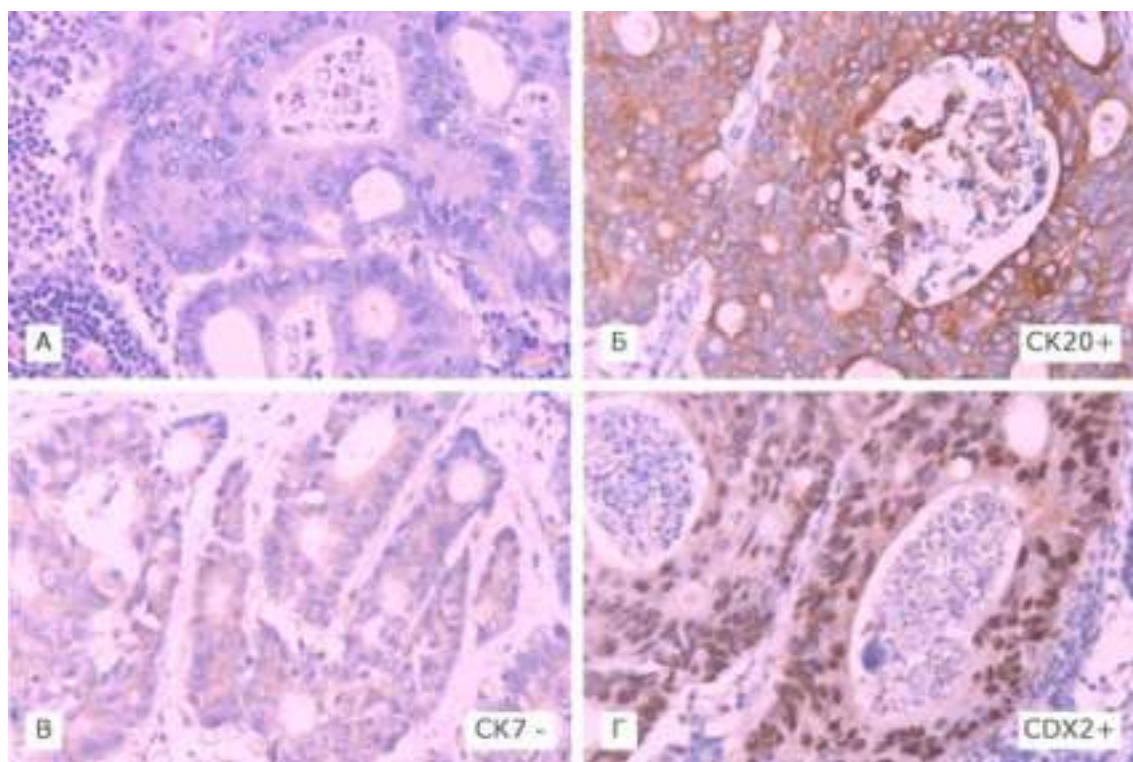


Рисунок 4.15 – Колоректальний фенотип метастатичної АК [СК 20 (+), СК 7 (-), CDX-2 (+)]. А. Будова відповідає помірнодиференційованій АК з частковим внутрішньоклітинним накопиченням слизу, забарвлення гематоксиліном і еозином. Б. Цитоплазматична позитивна реакція з СК 20 (+). В. Негативна реакція з СК 7 (-). Г. Інтрануклеарна експресія CDX-2 (+). Б-Г. ІГХ метод з гематоксиліном Майєра. Зб.: $\times 400$.

4.4.1. Розподіл локалізацій ураження, порівняння морфометричних та імуногістохімічних характеристик метастатичних та первинних карцином колоректального фенотипу

Дослідження органів ураження метастатичними АК колоректального профілю показало значну їх концентрацію 18 з 37 (48,65 %) в ділянках жіночої репродуктивної системи: (13 з яких (35,13 %) знайшли в яєчниках, а 5 в інших локалізаціях – шийка, тіло матки, піхва). Інші метастази – 7 печінки, 4 легень, 3 канцероматозу очеревини, далі по 1 локалізації (мозок, шкіра, простата, сечовід, надключичний лімфатичний вузол) (рис. 4.16). Серед них 5 вже з множинною дисемінацією. Не дивлячись на різноманітність місць знаходження, морфологічно група РНПЛ колоректального фенотипу частіше за все набувала рис помірнодиференційованої АК.

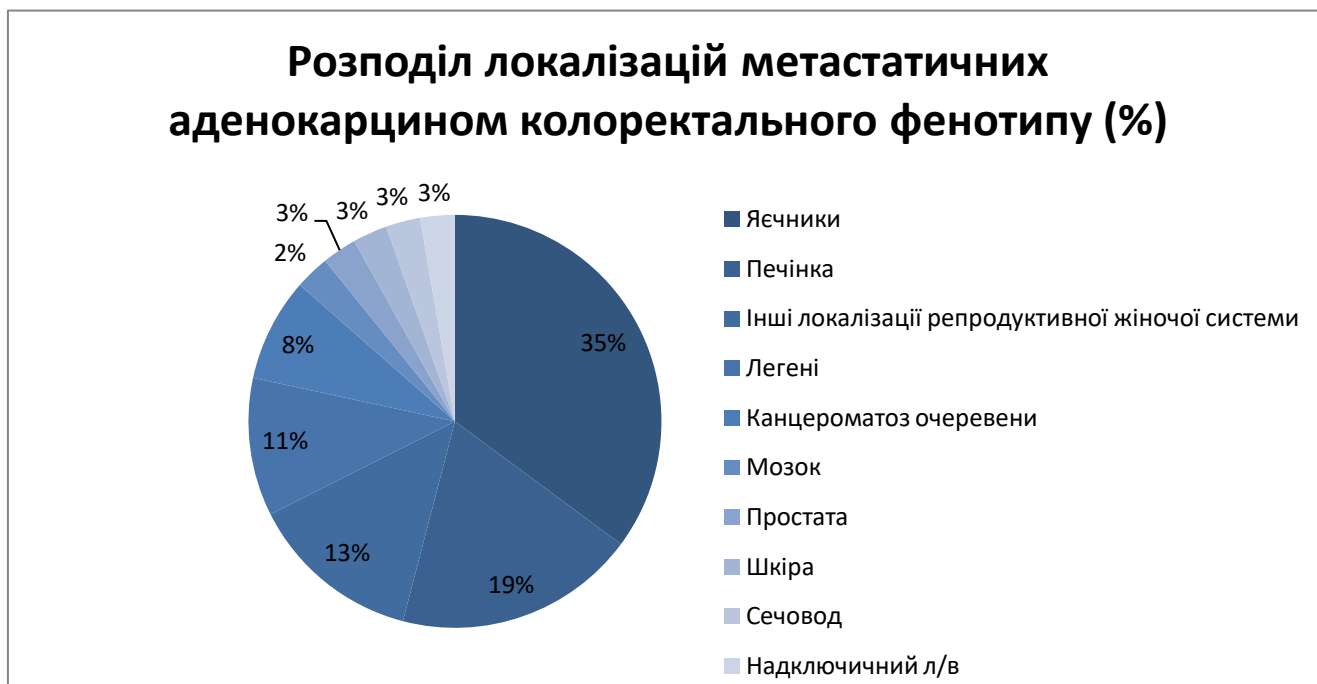


Рисунок 4.16 – Розподіл локалізацій метастатичних аденокарцином колоректального фенотипу [СК 20 (+), СК 7 (-), CDX-2 (+)], (%).

Розподіл локалізацій первинних пухлин товстої кишки продемонстрував перевагу ураження сигмовидної кишки 13 із 41 (31,71 %), далі 8 сліпої, 7 висхідного відділу ободової кишки, 6 поперечно-ободової кишки (в тому числі печінкового кута) 5 прямої, 1 апендиксу, 1 анусу. 2 спостереження вже

мали віддалені метастази, але в своїй більшості 21 із 41 (51,22 %) первинні пухлини товстої кишки були представлені помірnodиференційованими АК, подібно до групи колоректальних метастатичних АК (23 з 37; 62,16 %).

Порівняння вікових характеристик цих груп ($58,46 \pm 12,28$ років проти $60,56 \pm 12,81$ років) t-критерієм Стьюдента достовірної різниці не визначило ($p > 0,05$).

Порівняння даних цифрової морфометрії метастатичних та первинних АК колоректального профілю продемонструвало подібність за показниками площі та периметру (обидва $p > 0,05$) (табл. 4.9).

ІГХ профіль первинних КРР визначив найбільш специфічними маркерами [Pan CK AE1/3, CK 20 і CDX-2], що в усіх спостереженнях були позитивними, але деяку варіативність в експресії інших: CK 7 (4 із 41 (9,75 %) мали позитивний статус, що відповідало 1 недиференційованому раку, 2 низькодиференційованим АК та 1 АК помірного ступеня диференціації).

Таблиця 4.9 - Показники морфометричного дослідження ядер клітин спостережень метастатичних та первинних аденокарцином колоректального фенотипу в програмі ImageJ, n, $M \pm SD$, $\mu\text{км}^2$, $\mu\text{км}$

Тип карциноми	Площа я/к ($\mu\text{км}^2$)	Периметр я/к ($\mu\text{км}$)	Коефіцієнт круглості я/к
Метастатична АК колоректального фенотипу [CK 20 (+), CDX-2 (+), CK 7 (-)], (n=37)	$42,9 \pm 13,6$	$26,2 \pm 3,7$	$0,63 \pm 0,10$
Первинна АК товстої кишки, (n=41)	$38,8 \pm 12,3$	$23,9 \pm 3,7$	$0,74 \pm 0,08$
p	$p^* > 0,05$	$p^* > 0,05$	$p^* < 0,05$

Примітка. n – кількість пухлин, $M \pm SD$ – середнє значення \pm стандартне відхилення, я/к – ядра клітин, * - групи порівняні t-критерієм Стьюдента.

Треба відзначити, що в групі з метастатичними АК частково-позитивними на CK 7 виявились 2 метастази в печінку та тіло матки, що наряду з CK 20+ і CDX-2+ дало підставу вважати ці випадки колоректальними фенотипами. У зв'язку з переважанням жінок в обох групах (29 жінок з 37

метастатичних КРР та 24 жінки з 41 первинних КРР) та значну кількість спостережень метастатичного ураження репродуктивної системи (18 із 37, 48,65 %), були проаналізовані вікові показники тільки жінок окремих підгруп.

Вік жінок з первинними пухлинами товстої кишки (середній вік $60,54 \pm 12,25$ років) був старшим за жінок з метастазами репродуктивної системи (середній вік $59,26 \pm 13,40$ років) і жінок з метастазами АК колоректального профілю інших ділянок (середній вік $57,2 \pm 12,16$ років), але вірогідної відмінності t-критерієм Стьюдента виявлено не було (всі $p > 0,05$).

Резюме. АК колоректального профілю [СК 20 (+), CDX-2 (+), СК 7 (-)] в низькодиференційованих спостереженнях демонструють СК 7 (+) забарвлення окремих клітин паренхіми пухлини, це може приводити до діагностичних помилок через велику частку серед пацієнтів з КРР жінок і перевагу серед локалізацій метастатичного ушкодження яєчників, чиї первинні муцинозні АК мають схожі імунофенотипи та МФМ показники. Тому діагностика КРР у жінок завжди повинна містити маркери виключення карцином репродуктивної системи [CA-125, СК 7, ER, PGR, PAX-8, p16]. Жінки із метастазами АК колоректального фенотипу (особливо якщо він знаходиться поза межами репродуктивної системи) більш молоді, ніж жінки з первинною пухлиною товстої кишки, що говорить про стрімку дисемінацію таких раків при невеликому обсязі первинного джерела; вірогідно саме це дозволяє колоректальним АК опинитись в категорії раків без первинної локалізації.

4.4.2 Прогностичні імуногістохімічні маркери метастатичних та первинних карцином колоректального фенотипу

Аналіз експресії маркеру p53 в обох групах виявив відсутність найвищої градації (позитивної дифузної експресії в більше ніж 50 % клітин), здебільшого реакція була негативною (рис. 4.17), особливо в групі із первинними КРР, або фокальною позитивною (рис. 4.18), розподіл випадків занесений в таблиці 4.10 і 4.11 відповідно.

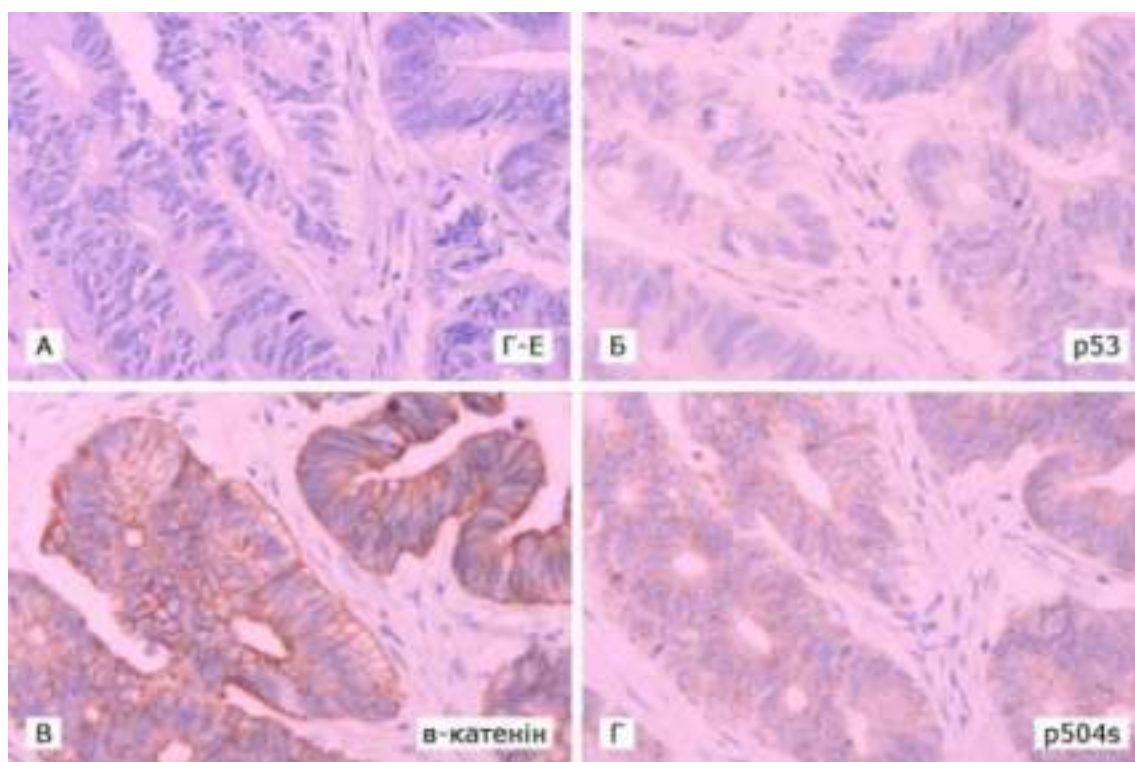


Рисунок 4.17 – Первинний КРР. А. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Б. Негативна реакція з p53. В. Мембранна (-) реакція з β -катеніном. Г. Слабка (+) експресія p504s. Б-Г. ІГХ з гематоксиліном Майєра. Зб.: $\times 400$.

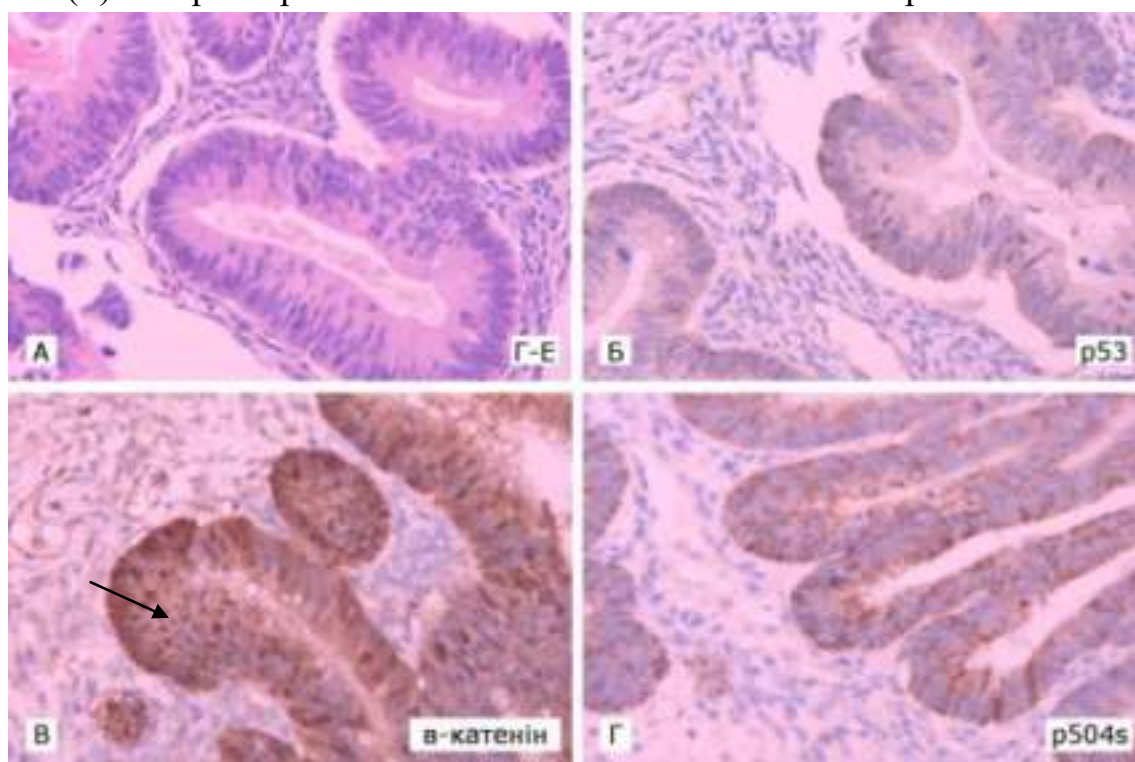


Рисунок 4.18 – Метастаз КРР. А. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Б. «Фокальна» (+) реакція з p53. В. Цитоплазматично-ядерна (+) реакція з β -катеніном. Г. Помірна ++ експресія p504s. Б – Г. ІГХ з гематоксиліном Майєра. Зб.: $\times 400$.

Таблиця 4.10 - Розподіл експресії прогностичних маркерів за клініко-морфологічними характеристиками груп метастатичних аденокарцином колоректального профілю та первинних аденокарцином товстої кишки, n, p

Група	Характеристика дослідження, (n)	p53		Ki-67		β-катенін		AMACR		HER-2/neu	
		(-)	(+) фокальна	10% - 25%	більше 25%	(-), (я) < 30%	(я) > 30%	0, + (слабка)	++ (помірна), +++	0 i 1+	2+ i 3+
Група 1 n ₁ =37	ч (n=8)	2	6	5	3	4	4	3	5	2	6
	ж (n=29)	14	15	6	23	14	15	9	20	22	7
p*		p>0,05		p<0,05		p>0,05		p>0,05		p<0,05	
Група 2 n ₂ =41	ч (n=17)	11	6	7	10	15	2	13	4	15	2
	ж (n=24)	21	3	12	12	21	3	18	6	20	4
p*		p>0,05		p>0,05		p>0,05		p>0,05		p>0,05	
Група 1 n ₁ =37	G1 (n=9)	6	3	4	5	7	2	6	3	8	1
	G2 (n=23)	8	15	7	16	10	13	5	18	15	8
	G3 (n=5)	2	3	0	5	1	4	1	4	1	4
p*		p>0,05		p>0,05		p>0,05		p>0,05		p<0,05	
Група 2 n ₂ =41	G1 (n=11)	10	1	5	6	11	0	9	2	11	0
	G2 (n=28)	21	7	9	19	24	4	22	6	23	5
	G3 (n=2)	1	1	0	2	1	1	0	2	1	1
p*		p>0,05		p>0,05		p>0,05		p>0,05		p>0,055	
Група 1: n ₁ =37		16	21	11	26	18	19	12	25	24	13
Група 2: n ₂ =41		32	9	14	27	36	5	31	10	35	6
p*		p<0,05		p>0,05		p<0,05		p<0,05		p>0,05	

Примітка. n – кількість пухлин, * - групи порівняні точним тестом Фішера, ч - чоловіки, ж - жінки, (я) – ядерна експресія.

Таблиця 4.11 – Розподіл експресії прогностичних маркерів за локалізаціями в групах дослідження, n, p

Група	Локалізація дослідження (n)	p53		Ki-67		β-катенін		AMACR		HER-2/neu	
		(-)	(+) фокальна	10% - 25%	25%	(-), (+) < 30%	(+) > 30%	0, +	++, +++	0 i 1+	2+ i 3+
Група 1: n ₁ =37	ЖРС (n=18)	8	10	6	12	10	8	8	10	12	6
	печінка (n=7)	4	3	2	5	2	5	1	6	5	2
	легені (n=4)	2	2	1	3	2	2	2	2	2	2
	ПІК (n=3)	1	2	1	2	1	2	1	2	2	1
	мозок (n=1)	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0
	шкіра (n=1)	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0
	простата (n=1)	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1
	сечовід (n=1)	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0
	НЛВ (n=1)	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Всього:	16	21	11	26	18	19	12	25	24	13	
p*		p>0,05		p>0,05		p>0,05		p>0,05		p>0,05	
Група 2: n ₂ =41	сліпа кишка (n=8)	6	2	3	5	7	1	6	2	7	1
	висхідний відділ клубової кишки (n=7)	5	2	2	5	5	2	4	3	6	1
	клубова кишки (з печінкового кута) (n=6)	5	1	3	3	5	1	4	2	5	1
	сигмоподібна кишка (n=13)	10	3	5	8	12	1	10	3	12	1
	пряма кишка (n=5)	4	1	1	4	5	0	5	0	4	1
	апендикс (n=1)	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1
	анус (n=1)	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0
Всього:	32	9	14	27	36	5	31	10	35	6	
p*		p>0,05		p>0,05		p>0,05		p>0,05		p>0,05	

Примітка. n – кількість пухлин, * - групи порівняні точним тестом Фішера, ЖРС – жіноча репродуктивна система, ПІК – ізольований папілярний канцероматоз, НЛВ – надключичний лімфатичний вузол.

Проліферативна активність за Ki-67, навпаки, не продемонструвала нижньої градації з низькою проліферацією (0-10 %), всі випадки КРР та метастазів мали помірну або високу проліферацію. Градації β -катенін, АМАСР та HER-2/neu отримали дві категорії градацій для тесту Фішера (табл. 4.10 і 4.11). Рис. 4.18 демонструє варіант надекспресії всіх прогностичних маркерів, що був виявлений в метастазі печінки, для порівняння на рис. 4.17 найбільш частий імунофенотип первинного КРР з (-) ядерною експресією p53 та β -катеніну, слабкою (+) експресією p504s (АМАСР) та негативною HER-2/neu. Згідно точного тесту Фішера знайдено різницю між групами 1 та 2 за експресією p53 ($p < 0,05$), β -катеніну ($p < 0,05$) та p504s ($p < 0,05$). Також в групі 1 серед жінок виявилась більшість метастазів КРР з високою проліферативною активністю (+++) за Ki-67 ($p < 0,05$) та з відсутністю позитивного HER-2/neu ($p < 0,05$), порівняно із чоловіками. Також в групі 1 серед метастазів колоректального фенотипу виявилась статистично достовірна тенденція падіння ступеня диференціювання і набуття ампліфікації HER-2/neu ($p < 0,05$).

Резюме. Ядерна транлокація β -катеніна, позитивна «фокальна» експресія p53 та помірна експресія АМАСР більше характерні для метастазів колоректального профілю, порівняно із місцево-розповсюдженими КРР (всі $p < 0,05$ відповідно).

Позитивний статус HER-2/neu (градації 2+ і 3+) достовірно частіше зустрічався у чоловіків метастатичних КРР, порівняно з жінками (6 з 8; 75,0 % проти 7 з 29; 24,1 %; $p < 0,05$) та накопичувався 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 ІП за Ki-67 (23 з 29; 79,3 % проти 3 з 8; 37,5%; $p < 0,05$).

Основні положення цього розділу опубліковані в 7-ми статтях [199-204] та 7-и тезах [205-211].

РОЗДІЛ 5

МОРФОМЕТРИЧНІ ТА ІМУНОГІСТОХІМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ СПРИЯТЛИВИХ НЕАДЕНОГЕННИХ ФЕНОТИПІВ КЛІНІКО- МОРФОЛОГІЧНОГО СИНДРОМУ «РАК НЕВІДОМОЇ ПЕРВИННОЇ ЛОКАЛІЗАЦІЇ»

5.1 Низькодиференційована карцинома з розподілом по середній лінії тіла (екстрагональний зародково-клітинний синдром)

Для порівняння екстрагональних пухлин з герміногенних клітин (ЕПГК), що є причиною проявів екстрагонального зародкового синдрому (фенотип РНПЛ за умови відсутності в анамнезі пухлини гонад), з первинними герміногенними пухлинами яєчок/яєчників було сформовано відповідні 2 групи спостереження.

Група 1 з ЕПГК ($n_1=8$), що включала карциноми знайдені в місцях по середній лінії тіла (ЦНС, середостіння, заочеревинний простір). Вони характеризувались достатньо молодим середнім віком пацієнтів, порівняно з іншими фенотипами РНПЛ. А саме, 2 випадки (25,0 %) ЕПГК ЦНС були знайдені у підлітків віком до 20 років, 3 (37,5 %) пухлини середостіння сталися у дорослих віком до 35 років (вік 26, 31, 34 роки відповідно), а у спостереженнях заочеревинного простору тільки 1 з 3 пацієнтів був старшим за 35 років.

Цікаво що, в спостереженнях медіастінальних пухлин всі пацієнти були чоловічої статі. Семінома / гермінома були найпоширенішим гістологічним типом групи 1, що становило 50 % всіх спостережень (2 в ЦНС і 2 в середостінні) (рис. 5.1). Клінічні прояви залежали від місця розташування, розміру пухлини.

В групі 2 з ПГК ($n_2=16$) навпаки, 63 % пацієнтів були дорослими чоловіками (вік більше 20 років), але більшість випадків також були представлені семіномами 37 % (6 з 16). Характеристики груп дослідження занесені в таблицю 5.1.

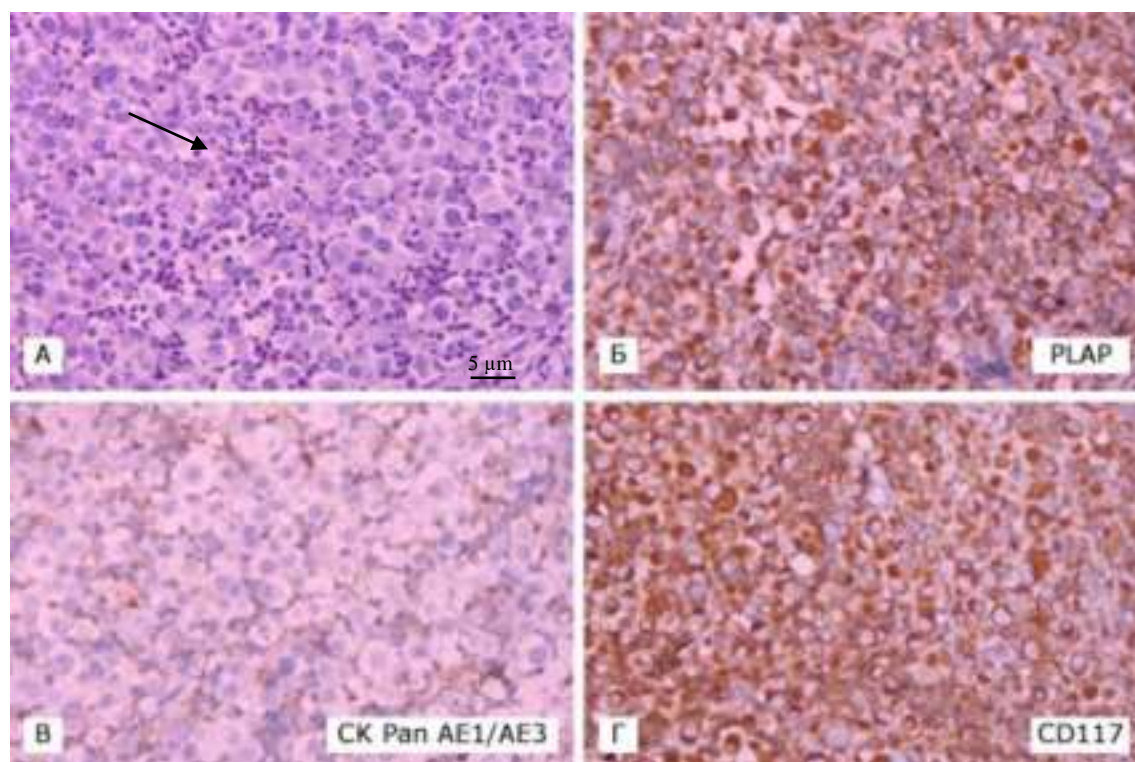


Рисунок 5.1 – А. Семінома, наявність інфільтрату з поліморфноядерних нейтрофілів (зазначено стрілкою), забарвлення гематоксиліном і еозином. Б. Позитивна експресія PLAP. В. Позитивна експресія Pan CK AE1/3 в частині клітин. Г. Інтенсивна експресія CD117. Б – Г. ІГХ з гематоксиліном Майєра. Зб.: ×400.

Таблиця 5.1 - Клініко-морфологічні характеристики, n, %

Характеристика	Група 1 n ₁ =8 (100 %)	Група 2 n ₂ =16 (100 %)
Стать		
чоловіки	7 (87,5 %)	10 (62,5 %)
жінки	1 (12,5 %)	6 (36,5 %)
Вік (середнє ± стандартне відхилення), роки	17,5±8,32	35,2±3,56
Локалізація пухлин групи 1:		
середостіння	3 (37,5 %)	-
ЦНС	2 (25,0 %)	-
заочеревинний простір	3 (37,5 %)	-
Первинна локалізація пухлин групи 2		
яєчко	-	12 (75,0 %)
яєчник	-	4 (25,0 %)
Гістологічна форма		
семінома/гермінома	4 (50,0 %)	6 (37,5 %)
ембріональна карцинома	2 (25,0 %)	5 (31,3 %)
змішана ПГК	1 (12,5 %)	3 (18,7 %)
пухлина жовткового мішка	1 (12,5 %)	2 (12,5 %)

5.1.1 Порівняння імунофенотипів екстрагонадних та місцево-розповсюджених пухлин з герміногенних клітин

ІГХ маркери, що були використані для порівняння груп дослідження включали широкий набір антитіл, що за даними літератури вірогідно мають діагностичне значення для герміногенних пухлин: [Pan CK AE1/3, PLAP – Placental alkaline phosphatase (плацентарна лужна фосфатаза), CD117, HCG – Human chorionic gonadotropin (хоріонічний гонадотропін), α FP (α -фетопротеїн), CD30, EMA] (табл. 5.2).

Pan CK AE1/3, як маркер первинної ланки ІГХ, слугував орієнтиром відбору карцином, і тому був позитивним у всіх випадках обох груп хоча б в частині клітин. Найслабшу експресію показав в спостереженнях семіном / герміном, що мало диференційно-діагностичне значення (рис. 5.2).

PLAP переважно розташовувався в клітинній мембрані і цитоплазмі. Був виявлений у всіх типах герміном / семіном обох груп, але з різною інтенсивністю (надекспресія – більше 50 %, мала місце в 50 % (2 з 4) спостережень групи 1, та 83,3 % (5 з 6) – в групі 2), і частинах змішаних пухлин, де були присутні ділянки герміном із відповідною морфологією.

CD117 з максимальною експресією було виявлено у 75,0 % (3 з 4) гермінома / семіноми групи 1, та 66,7 % (4 з 6) – групи 2. З різною інтенсивністю CD117 реагував також в компонентах змішаних пухлин з герміногенних клітин. Жодне спостереження пухлин жовткового мішка та ембріональних карцином не експресувало CD117, що було досить патогноманічним, тільки змішані пухлини з компонентами із герміноми і інших пухлин з герміногенних клітин мали позитивне забарвлення на CD117.

Інтенсивна експресія маркерів [CD30, EMA і Pan CK AE1/3] виявилась діагностично значущою в зразках ембріональної карцином, і їх компонентах в змішаних пухлинах. α FP-позитивне фарбування було показовим тільки для пухлин жовткового мішка, а HCG не мав позитивного фарбування в жодному випадку. З таблиці 5.2 видно, що необхідність використання групи маркерів

(підтвердження та виключення) необхідно для правильної верифікації фенотипу пухлин з герміногенних клітин, особливо в змішаних варіантах.

Таблиця 5.2 - Розподіл експресії імуногістохімічних маркерів в групах дослідження пухлин з герміногенних клітин екстрогонадного та гонадного розташування, n

Група	Кількість (n)	PLAP		CD117		Pan CK		HCG		AFP		CD30		EMA	
		(0)*, < 50 %	більше 50 %	(0)*, < 50 %	більше 50 %	(0)*, < 50 %	більше 50 %	(0)*, < 50 %	більше 50 %	(0)*, < 50 %	більше 50 %	(0)*, < 50 %	більше 50 %	(0)*, < 50 %	більше 50 %
група 1 ЕПГК всього:	8	1*,4	3	3*,1	4	2*,3	3	8*	0	7	1	5*,1	2	3	5
С / Г	4	2	2	1	3	2*,2		4*		4*		4*		3	1
ЕК	2	1*,1		2*			2	2*		2*			2		2
ПЖМ	1	1		1*			1	1*			1	1*			1
Г+ ЕК	1		1		1	1		1*		1*		1			1
група 2 ПГК всього:	16	3*,6	7	7*,3	6	3*,5	8	16*	0	12*	4	10*,1	5	2*,7	7
С / Г	6	1	5	2	4	2*,4		6*		6*		6*		2*,4	
ЕК	5	3*,2		5*			5	5*		5*		1	4	1	4
ПЖМ	2	2		2*			2	2*			2	2*			2
Г+ ЕК	1		1		1		1	1*		1*			1		1
Г + ПЖМ	2	1	1	1	1	1*,1		2*			2	2*		2	

Примітка. ЕПГК – екстрогонадні пухлини з герміногенних клітин, ПГК – пухлини з герміногенних клітин; * - немає експресії в жодній клітині, С – семінома, Г – гермінома, ЕК – ембріональна карцинома, ПЖМ – пухлина жовткового мішку, проводився тільки якісний аналіз розподілу, статистична різниця не розраховувалась внаслідок невеликої кількості випадків.

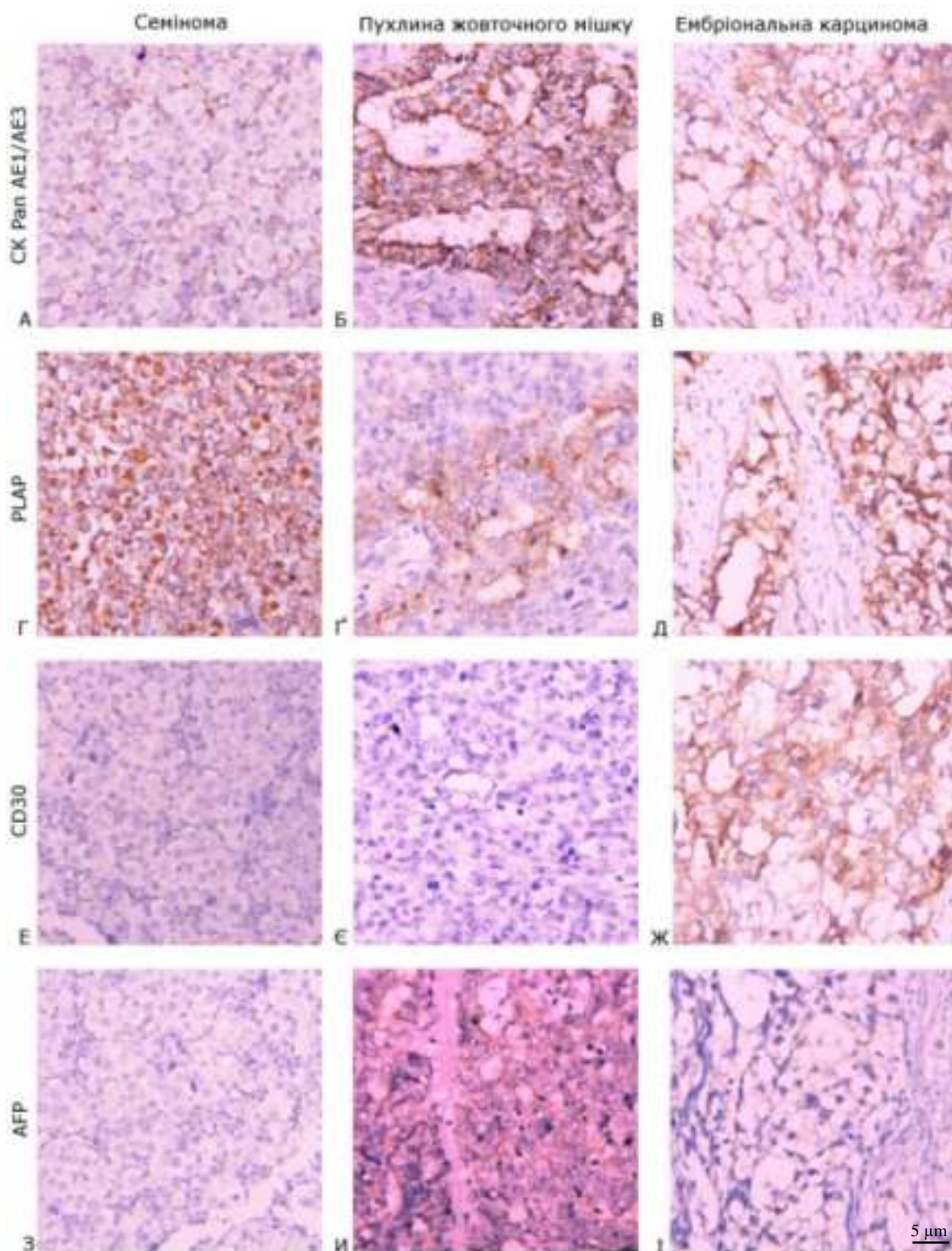


Рисунок 5.2 - Семінома (А, Г, Е, З). Пухлина жовткового мішка (Б, Г, Є, И). Ембріональна карцинома (В, Д, Ж, І). А – В. Експресія Рар СК АЕ1/3 найслабша в семіномі. Г – Д. Експресія PLAP різної інтенсивності. Е – Ж. Експресія CD30 позитивна тільки в ембріональній карциномі. З – І. Експресія AFP позитивна тільки в пухлині жовткового мішка. ІГХ з додатковим забарвленням гематоксином Майєра. Зб.: $\times 400$.

5.1.2 Морфометрична характеристика окремих типів пухлин з герміногенних клітин в програмі ImageJ

Вимірювання ядер проводили в типових варіантах пухлин (змішані форми було виключено) для отримання точних диференційно-діагностичних критеріїв. Найбільшими за розміром ядра клітин продемонструвала семінома в обох групах дослідження, далі за розмірами ембріональна карцинома і пухлина з жовткового мішка. За типами пухлин різниці в обох групах виявлено не було (всі $p > 0,05$) (табл. 5.3). Співставлення параметрів ядер клітин пухлин з розмірами ЗЛ виявило різницю в площі та периметрі (всі $p < 0,05$), але показники коефіцієнта круглості відмінності з ЗЛ не показали (табл. 5.3).

Таблиця 5.3 – Показники цифрової морфометрії ядер клітин груп дослідження пухлин з герміногенних клітин у програмі ImageJ, n , $M \pm SD$ мкм², мкм

Типи пухлин	Група, (n)	Площа я/к (мкм ²)	Периметр я/к (мкм)	Коефіцієнт круглості я/к	p_1 - різниця між ЕПГК та ПГК
Семінома (1)	ЕПГК, (n=4)	47,6±4,04	31,8±1,32	0,80±0,12	$p_{пл} > 0,05$, $p_{пр} > 0,05$, $p_{кк} > 0,05$
	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	$p_{пл} > 0,05$, $p_{пр} > 0,05$, $p_{кк} > 0,05$
	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	$p_{пл} > 0,05$, $p_{пр} > 0,05$, $p_{кк} > 0,05$
	ПГК, (n=2)	28,4±3,84	23,7±2,43	0,73±0,13	
Еталон МФМ (ЗЛ)		16,7±2,69	15,9±1,54	0,75±0,09	
p_2 - різниця між ЕПГК та звичайними лімфоцитами		$p_{(1)} \< 0,05$ $p_{(2)} \< 0,05$ $p_{(3)} \< 0,05$	$p_{(1)} \< 0,05$, $p_{(2)} \< 0,05$, $p_{(3)} \< 0,05$	$p_{(1)}^* > 0,05$ $p_{(2)}^* > 0,05$ $p_{(3)}^* > 0,05$	

Примітка. n – кількість пухлин, $M \pm SD$ – середнє значення \pm стандартне відхилення, я/к – ядра клітин, * - групи порівняні t-критерієм Стюдента, & - групи порівняні U-критерієм Манна-Уїтні, $p_{пл}$ – за площею, $p_{пр}$ – за периметром, $p_{кк}$ – за коефіцієнтом круглості, ЕПГК - екстрагональні пухлини з герміногенних клітин, ПГК - пухлини з герміногенних клітин, ЗЛ – звичайні лімфоцити.

Резюме. Мінливість гістологічної картини змішаних форм пухлин з герміногенних клітин і вірогідність екстрагонадного розташування робить імуногістохімічне дослідження ключовим інструментом у диференційній діагностиці фенотипів клініко-морфологічного синдрому «РНПЛ». Маркери PLAP і CD117 показали найбільшу експресію в герміномах/семінамах, їх значення МФМ більше ніж в три рази за площею і два рази за периметром перевищували звичайні лімфоцити ($p_{пл} < 0,05$, $p_{пр} < 0,05$).

Експресія CD30, EMA і Pan CK AE1/3 виявилась діагностично значущою в зразках ембріональної карциноми, МФМ показники в середньому в 2,1 рази за площею та 1,7 за периметром перевищували ЗЛ ($p_{пл} < 0,05$, $p_{пр} < 0,05$).

Статус за маркером α FP (+) був показовим для пухлин жовткового мішка, в яких МФМ показники більше ніж в 1,7 рази за площею та 1,5 за периметром перевищували ЗЛ ($p_{пл} < 0,05$, $p_{пр} < 0,05$).

5.2 Ізольовані метастази плоскоклітинної карциноми шийних лімфатичних вузлів

Для дослідження зустрічаємості, ІГХ та морфологічних особливостей метастазів плоскоклітинних раків (ПР) в лімфатичних вузлах шиї (ЛВШ), як сприятливого фенотипу РНПЛ, було відібрано 62 зразка біопсій ЛВШ (група 1). Всі ізольовані метастази карцином без знайдених первинних джерел, які відповідали фенотипу [Pan CK AE1/3 (+), Vimentin (-/+), CD45 (-), S100 і/або НМВ45 (-)], з «гніздами» круглих або овальних клітин та чіткою десмопластичною реакцією стромы із судинами, що розділяли пухлинну тканину на групи однорідних клітин.

Для еталонної групи порівняння були відібрані 58 спостережень ПР відомої локалізації голови та шиї (29 гортані, 14 ротоглотки, 10 синусів верхньої щелепи, 4 шкіри обличчя, 1 нижня губа), що мали безсумнівну гістологічну картину плоскоклітинного диференціювання (група 2).

Треба зазначити, що ПР групи 2 відомої локалізації були представлені – 55,17 % помірнодиференційованими ПР (32 з 58), 32,75 % - високодифере-

нційованими ПР (19 з 58) та 12,06 % ПР низької диференціації (2 з 12), що співпадає із загальними статистичними показниками розподілу гістологічних варіантів ПР голови та шиї. Також всі відібрані спостереження групи 2 строго відповідали фенотипу [Pan CK AE1/3 (+), Vimentin (-), CK HMW (+), p63 (+), CK 7 (-), CK 20 (-), TTF-1 (-), p16^{INK4A} (+/-)], що доводило їх плоскоклітинну диференціацію, без аденогенного компоненту. Негативний статус за TTF-1 (-) (фактором транскрипції щитоподібної залози-1) робив маловірогідним походження такого метастазу з первинних карцином легенів або щитоподібної залоз (рис 5.3).

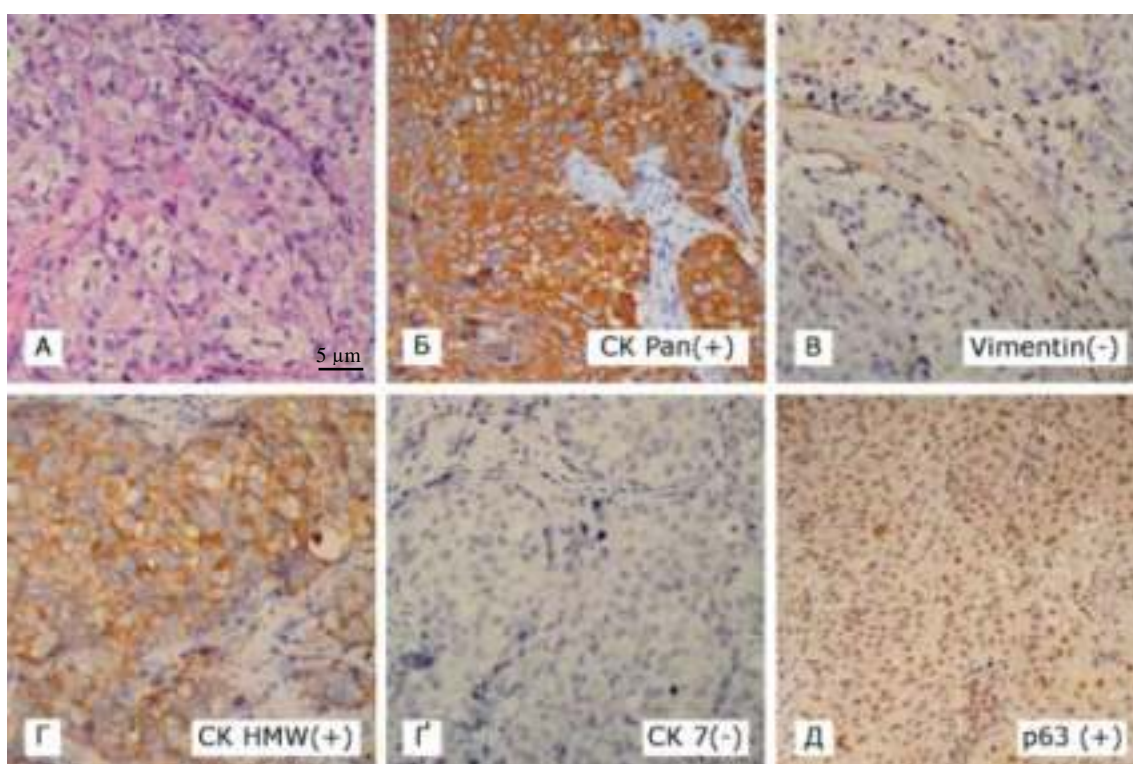


Рисунок 5.3 - Помірнодиференційований ПР гортані групи 2. А. Забарвлення гематоксилініном і еозином. Б. Позитивна експресія Pan CK AE1/3 всіх клітин зрізу. В. Негативна реакції пухлинних клітин і позитивна – сполучної тканини з маркером Vimentin. Г. Помірна експресія плоских СК HMW. Є. Негативна реакція з СК 7 всіх клітин зрізу (відсутність аденогенного диференціювання). Д. Ядерна експресія з p63. Б – Д. ІГХ з гематоксиліном Майєра. Зб.: ×400.

Окрему характеристику заслуговує маркер p16^{INK4A}, що був негативним в спостереженнях ПР гортані, шкіри обличчя та нижньої губи (носив виключно інтрануклеарний характер поодиноких клітин) та позитивним (змішана

ядерно-цитоплазматична реакція скупчень «блоків» клітин) в 57,14 % (8 з 14) ПР ротоглотки та 40,00 % (4 з 10) ПР верхньощелепної пазухи.

На відміну від ПР ротоглотки, де з вірусом папіломи людини пов'язаний розвиток $p16^{INK4A}$ -позитивних папілом та базалоїдних варіантів ПР, доказом чого стали залишки цих новоутворень в біоптатах наряду з інвазивним ПР, $p16^{INK4A}$ -позитивні зразки ПР верхньощелепної пазухи відносились до типових незроговілих форм ПР, що показали тісний зв'язок з диспластичним багат шаровим епітелієм, який мав непрямі ознаки вірусного ураження, такі як койлоцитоз, дискератоз, паракератоз та хронічне запалення підлеглої стромі (рис. 5.4).

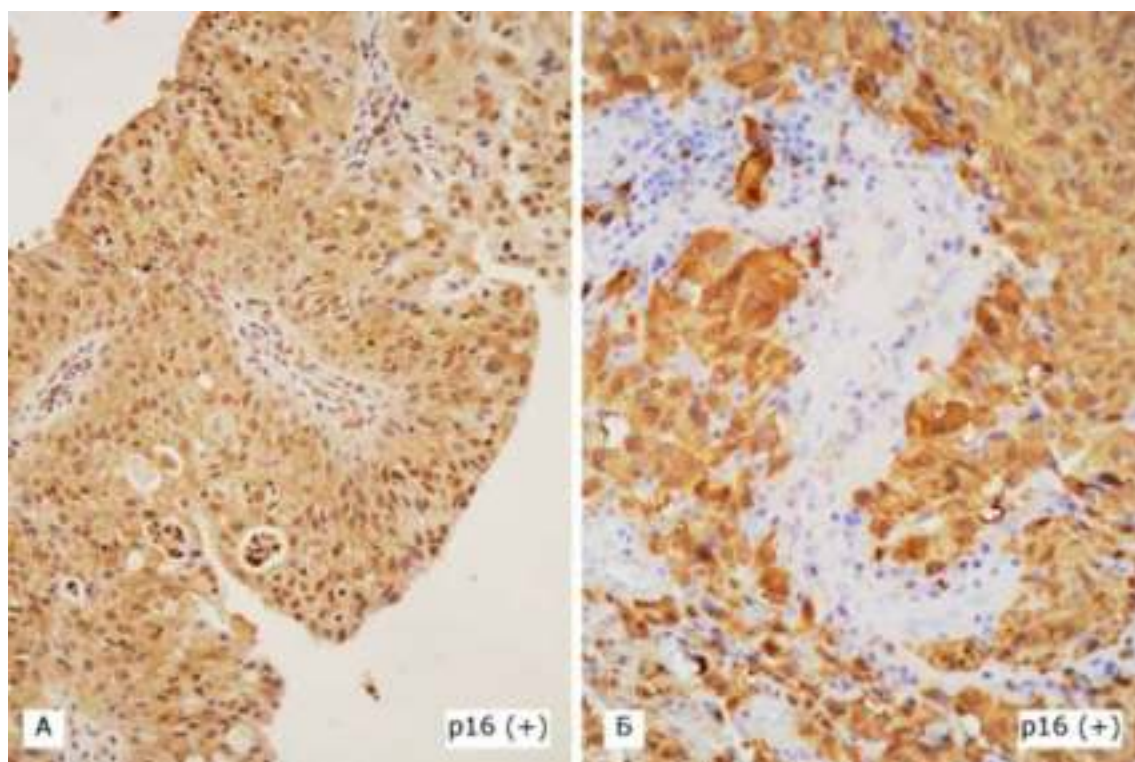


Рисунок 5.4 – А. Папілома ротоглотки з ділянками ПР, позитивна ядерно-цитоплазматична експресія $p16^{INK4A}$, ІГХ з гематоксиліном Майєра. Зб.: $\times 200$. Б. Помірnodиференційований незроговілий ПР верхньощелепної пазухи, позитивна ядерно-цитоплазматична експресія $p16^{INK4A}$, ІГХ з гематоксиліном Майєра. Зб.: $\times 400$.

Таким чином, зазвичай прогностичний онкомаркер $p16^{INK4A}$ в цьому випадку носить диференційно-діагностичний характер, пов'язаний з ВПЛ-

асоційованим шляхом канцерогенезу, і може бути корисним для передбачення метастазів ПР ротоглотки або верхньощелепної пазухи.

5.2.1 Порівняння імуногістохімічного профілю метастазів карцином невідомих первинних локалізацій в лімфатичні вузли шиї з характеристиками плоскоклітинних раків голови та шиї

Після аналізу результатів другого етапу ІГХ дослідження з вищезазначеними маркерами 62 випадків ізольованого ураження ЛВШ, ми отримали розподіл метастазів на три підгрупи за наявністю плоскоклітинного диференціювання:

(1 а) визначений ПР без первинного джерела 56,45 % ($n_1=35$): [Pan CK AE1/3 (+), CK HMW (+), p63 (+)];

(1 б) сумнівний (низькодиференційований) ПР або недиференційований рак 12,9 % ($n_2=8$): [Pan CK AE1/3 (+), CK HMW (+ або +/-), p63 (-)];

(1 в) «інші» карциноми 30,64 % ($n_3=19$): [Pan CK AE1/3 (+), CK HMW (-), p63 (-)].

Клінічні характеристики пацієнтів підгрупи 1а (визначений ПР), яка відповідала вимогам сприятливого фенотипу РНПЛ, були: 12 жінок і 23 чоловіків з середнім віком $51,26 \pm 10,23$ років, що за t-критерієм Стьюдента достовірно не відрізнявся від віку групи порівняння ПР голови і шиї відомих локалізацій ($62,14 \pm 8,87$ років, всі чоловіки); $p > 0,05$.

З морфологічних характеристик можна виділити відмінності, пов'язані з розподілом варіантів диференціювання – 54,29 % (19 із 35) ПР помірного (G2) і 45,71 % (16 із 35) ПР низького (G3) ступеня диференціації. До того ж, тільки 77,14 % (27 із 35) спостережень мали чіткий імунотип еталонної групи [Pan CK AE1/3 (+), Vimentin (-), CK HMW (+), p63 (+), CK 7 (-), CK 20 (-), TTF-1 (-)]; 11,43 % випадків (4 із 35) показали (+) статус за Vimentin (+) і 11,43 % (4 із 35) продемонстрували (+) статус за CK 7 (+); але всі ПР підгрупи (1 а) виявились TTF-1 негативними (рис. 5.5 А – В). Стосовно статусу ме-

тастазів ПР за $p16^{INK4A}$, знайдено було тільки 8,57 % (3 з 35) позитивних спостережень (2 жінки і 1 чоловік), що дало можливість припустити первинне джерело ПР в ділянках ротоглотки або пазухи верхньої щелепи.

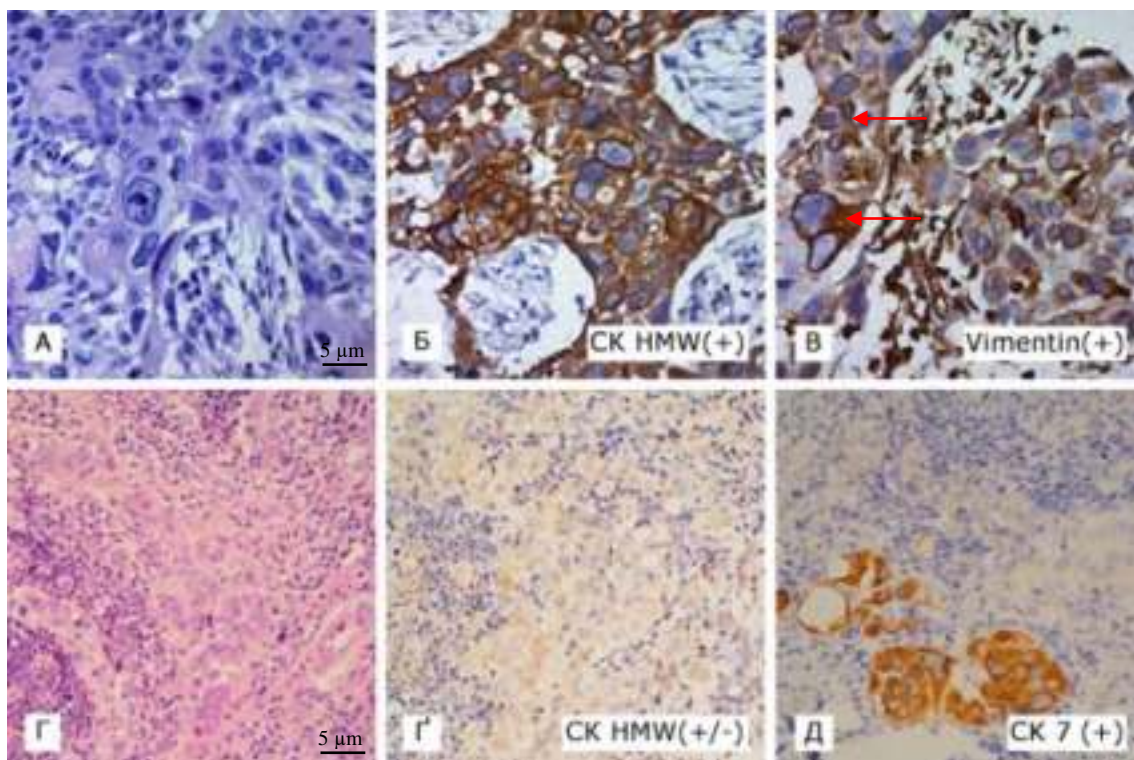


Рисунок 5.5 – Метастаз великоклітинного ПР в ЛВШ з підгрупи (1 а). А. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Б. Цитоплазматична експресія СК НМВ, ІГХ з гематоксиліном Майєра. В. Експресія Vimentin в клітинах стромы та пухлини (стрілки), ІГХ з гематоксиліном Майєра. Зб.: $\times 400$.

Метастаз низькодиференційованного ПР в ЛВШ з підгрупи (1 б). Г. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Д. Слабка та часткова експресія СК НМВ більшості клітин ПР, ІГХ з гематоксиліном Майєра. Е. Інтенсивна експресія СК 7 окремих груп клітин (часткова аденогенна диференціація), ІГХ з гематоксиліном Майєра. Зб.: $\times 400$.

Підгрупа (1 б) з експресією плоских цитокератинів СК НМВ (+ або +/-) і негативним статусом за $p63$ (-) була неоднорідною за фенотипами (рис 5.5 Г – Е): 50 % (4 із 8) мали позитивні реакції з [Vimentin (+), СК 7 (+), TTF-1 (+)]; 3 метастази папілярного раку щитоподібної залози та 1 метастаз раку легенів; 37,5 % (3 із 8) були позитивні тільки з СК 7 (+); 12,5 % (1 із 8) з СК7 (+) і СК 20 (+). Остання підгрупа (1 в) «інших» [СК НМВ (-), $p63$ (-)] карцином мала різнобарвний склад і характеризувалась єдиним постійним позитивним мар-

кером – Pan CK AE1/3 (+). 42,10 % (8 із 19) «інших» карцином мали позитивні реакції з CK 7 (+), біля 50 % продемонстрували позитивність за маркером TTF-1 (+), джерело цих метастазів вірогідно пов'язано із АК легенів; 26,32 % (5 із 19) показали імунореактивність з Vimentin (+), цікаво, що половина заключних патологоанатомічних діагнозів саме цієї підгрупи виявилися недиференційовані раки, низькодиференційовані аденогенні раки та низькодиференційовані аденокарциноми (рис. 5.6).

Розподіл гістологічних форм ізольованих уражень ЛВШ карциномами невідомої первинної локалізації після другого етапу ПХ дослідження продемонстрував переважання ПР (53,85 %) з фенотипом [Pan CK AE1/3 (+), CK NMW (+), p63 (+), CK 20 (-), TTF-1 (-), Vimentin (-/ 4 випадки +), CK 7 (-/ 4 випадки +)], подібним до еталонної групи 2 ПР голови та шиї (рис. 5.6).

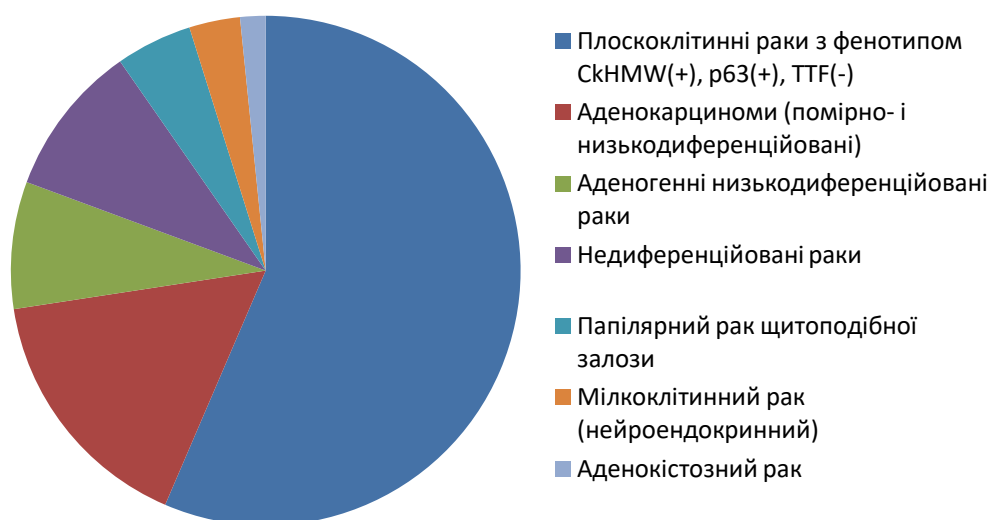


Рисунок 5.6 – Розподіл гістологічних форм РНПЛ з ізольованим ураженням лімфатичних вузлів шиї, (%).

Друге місце посіли АК з вірогідною первинною локалізацією в легенях (TTF-1+), молочній залозі (естрогенові рецептори +) та яєчниках (CA-125+). За даними літератури, загальний відсотковий розподіл гістологічних форм всіх РНПЛ має декілька іншу структуру, де на першому місці (50 %) АК різного ступеня диференціювання, на другому (35 %) низькодиференційовані карциноми (АК та раки без залозистої будови) та третє місце поділяють між

собою (по 5 %) недиференційований рак, ПР та НЕК. Значно вищий відсоток ПР локалізації РНПЛ в ЛВШ відносно загального розподілу (53,85 % проти 5 %) робить вірогідним припущення походження більшість з ПР саме з голови та шиї.

5.2.2 Морфометрична характеристика первинних плоскоклітинних карцином голови та шиї та підгруп метастатичних карцином в лімфатичні вузли шиї

Розрахувавши середні розміри ядер клітин ПР підгрупи (1 а), отримали подібні до контрольної групи показники площі, периметру та коефіцієнту круглості, але загалом ядра клітин були трохи менших розмірів ($p(1a) < 0,05$, $p(1a) > 0,05$ відповідно) та менш круглі (витягнуті, поліморфні $p(1a) < 0,05$), що відповідає гістологічним формам ПР з низьким ступенем диференціації, які, доречі, в підгрупі 1а займали 45,71 % (16 з 35) спостережень.

Середні морфометричні показники підгрупи (1 б) були значно менші ніж у підгрупи (1 а) та еталонної групи 2 (всі $p(1б) < 0,05$), вірогідно в наслідок присутності в цій підгрупі метастазів папілярного раку щитоподібної залози, з невеликими подібними до НЕК, тільки овальними ядрами (площа $27,74 \pm 8,37$ мкм²; периметр $21,60 \pm 2,45$ мкм; коефіцієнт круглості 0,63). Середні розміри ядер клітин АК підгрупи (1 в) були подібні до (1 б), а саме ядра виявились менших розмірів та більш витягнуті, порівняно із ПР підгрупи (1 а) та еталонної групи 2 (всі $p(1в) < 0,05$) (табл. 5.4).

Резюме. Таким чином, значна відмінність в розподілі гістологічних форм РНПЛ з ізольованим ураженням лімфатичних вузлів шиї, в переважанні плоскоклітинних раків 56,45 % (35 з 62), порівняно із загальним розподілом гістологічних форм для всіх РНПЛ, робить вірогідним припущення походження таких метастазів ПР саме з голови та шиї.

Таблиця 5.4 – Порівняння морфометричних показників ядер клітин первинних плоскоклітинних карцином голови та шиї з підгрупами метастатичних карцином лімфатичних вузлів шиї без відомого первинного джерела, n, M±SD, мкм², мкм

Група дослідження	Площа я/к (мкм ²)	Периметр я/к (мкм)	Коефіцієнт круглості я/к
Підгрупа 1а, (n= 35)	62,7±17,73	32,9±6,01	0,69±0,13
Підгрупа 1б, (n= 8)	31,6±7,91	23,0±2,75	0,57±0,10
Підгрупа 1в, (n= 19)	43,5±10,79	26,3±3,37	0,67±0,14
ПР голови та шиї (група 2), (n=48)	75,5±27,77	44,1±11,12	0,78±0,05
p*	p(1а)<0,05, p(1б)<0,05, p(1в)<0,05.	p(1а)>0,05 p(1б)<0,05, p(1в)<0,05.	p(1а)<0,05, p(1б)<0,05, p(1в)<0,05.

Примітка. n – кількість пухлин, M±SD – середнє значення ± стандартне відхилення, я/к – ядра клітин, * - порівняння кожної підгрупи групи 1 проводили з групою 2 t-критерієм Стюдента, ПР – плоскоклітинний рак.

Подібність ІГХ та МФМ характеристик 56,45 % (35 з 62) метастатичних ПР без відомих локалізацій (підгрупа 1 а) з фенотипом [Pan CK AE1/3 (+), CK HMW (+), p63 (+), TTF-1 (-), Vimentin (-/+), CK 7 (-/+), p16^{INK4A} (+/-)] до зразків ПР голови і шиї відомих локалізацій, робить обґрунтованим підхід лікування таких пацієнтів, як при первинному локальному ПР голови та шиї із ураженням регіонарних ЛВШ. Показники цифрової морфометрії площі, периметру та коефіцієнту круглості метастазів ПР в ЛВШ порівняно з первинними ПР голови та шиї, показали що за t-критерієм Стюдента ядра клітин достовірно були менших розмірів за площею (**p<0,05**) та більш витягнуті та поліморфні (**p<0,05**), що відповідає низькодиференційованим гістологічним формам ПР, які серед метастатичних ПР займали 45,71 % (16 з 35).

Маркер p16^{INK4A} був негативним в ПР гортані, шкіри обличчя та нижньої губи (інтрануклеарні реакції поодиноких клітин) та позитивним (змішана ядерно-цитоплазматична реакція скупчень «блоків» клітин) в 57,14 % (8 з 14) ПР ротоглотки та 40,00 % (4 з 10) ПР верхньощелепної пазухи. В метастазах ПР знайдено було тільки 8,57 % (3 з 35) p16^{INK4A} (+) спостережень (2 жін-

ки і 1 чоловік), що дало можливість припустити походження цих ПР з ротоглотки або пазухи верхньої щелепи.

5.3 Ізольована пахова аденопатія (метастаз плоскоклітинного раку)

Для дослідження особливостей фенотипу «попереднього РНПЛ» з метастазом ПР в паховий лімфатичний вузол (ПЛВ) було проаналізовано біопсійний матеріал 59 пацієнтів з ізольованим ураженням ПЛВ (35 жінок та 24 чоловіків). Після первинної ІГХ панелі за алгоритмом діагностики пухлин без первинної локалізації, всі спостереження було розподілено на 4 групи, що продемонструвало відмінності за віком та гендерним показником (табл. 5.5).

Таблиця 5.5 – Розподіл імунофенотипів уражень пахових лімфатичних вузлів за статтю та віком, n, (%), M±SD

Імунофенотипи уражень ПЛВ, n (%)	Стать n (%)	Вік M±SD, роки
Pan CK AE1/3 (-), Vim.(+), CD45(+), S100 і/або НМВ45 (-), лімфопрліферативні стани, 39 (66,10)	Ж 21 з 39 (53,85)	57,08±17,32
	Ч 18 з 39 (46,15)	55,72±12,35
Pan CK AE1/3 (+), Vim.(-), CD45(-), S100 і/або НМВ45 (-), метастази карцином без первинної локалізації, 11 (18,64)	Ж 7 з 11 (63,64)	64,17±11,41
	Ч 4 з 11 (36,36)	59,75±11,32
Pan CK AE1/3 (-), Vim.(+), CD45(-), S100 і/або НМВ45 (+), метастази меланоми, 7 (11,86)	Ж 6 з 7 (85,71)	61,50±22,01
	Ч 1 з 7 (14,29)	70
Pan CK AE1/3 (-), Vim.(+), CD45(-), S100 і/або НМВ45 (-), метастази мезенхімальних пухлин, 2 (3,39)	Ж 1 з 2 (50,00)	61
	Ч 1 з 2 (50,00)	42

Примітка. M±SD – середнє значення ± стандартне відхилення, ПЛВ – пахові лімфатичні вузли, ж – жінки, ч – чоловіки.

Таким чином, відокремилось 11 пацієнтів (7 жінок та 4 чоловіків) з метастазами карцином в ізольований ПЛВ невідомої первинної локалізації, що розглядались як предмет діагностичного пошуку. У зв'язку з вірогідним по-

ходженням метастазів в ПЛВ з сечостатевої системи, їх характеристику логічно проводити для жінок та чоловіків окремо. З метою порівняння імуноморфологічних та МФМ характеристик виявлених анонімних метастазів ПР була сформована група з 13 спостережень ПР статевих органів відомих локалізацій (7 ПР шийки матки у жінок та 6 ПР статевих органів у чоловіків), віком від 43 до 72 років (середній вік $64,25 \pm 9,32$ років).

5.3.1 Дослідження імуногістохімічних та морфометричних характеристик ізольованої пахові аденопатії у жінок

Аналіз варіантів метастатичних карцином або, так званих, «попередніх РНПЛ» серед жінок показав наявність більшості 57,14 % (4 з 7) з будовою ПР – [Pan CK AE 1/3 (+), Vimentin (-), CK HMW (+), CK 7 (-), CK 20 (-), p63 (+), p16^{INK4A} (+)] (рис. 5.7).

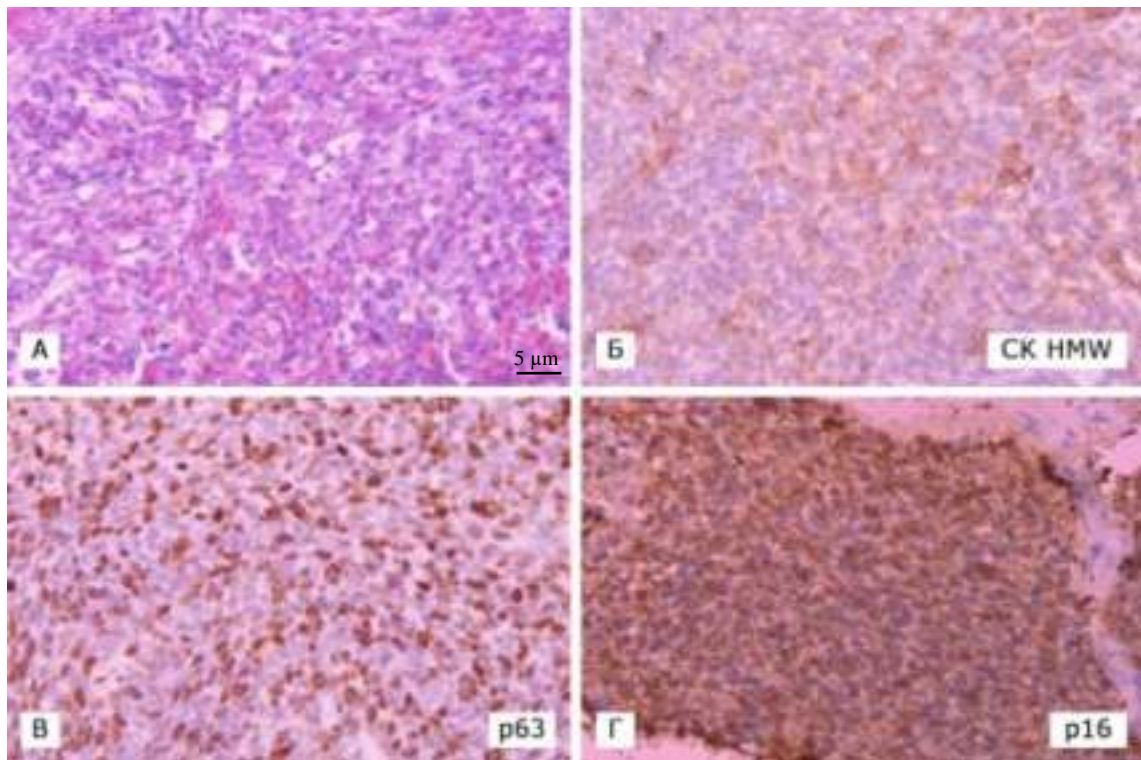


Рисунок 5.7 – Метастаз низькодиференційованого ПР вірогідно з шийки матки. А. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Б. Слабка експресія СК HMW, ІГХ з гематоксиліном Майєра. В. Позитивна ядерна експресія маркера базальноклітинної диференціації p63, ІГХ з гематоксиліном Майєра. Г. Позитивна ядерно-цитоплазматична реакція з p16^{INK4A} у вигляді блоку», ІГХ з гематоксиліном Майєра. Зб.: $\times 400$.

3 (75,00 %) з них мали помірно плоскоклітинне диференціювання, а 1 (25 %) – низьке, з слабкою експресією діагностичного СК НМВ (+/-). Позитивна експресія онкопротеїну p16^{INK4A} (ядерно-цитоплазматичне забарвлення в «блоках» епітеліальних клітин), яка демонструє ВПЛ-асоційований шлях канцерогенезу, робить вірогідною первинну локалізацію метастазів цих ПР в шийці матки (рис. 5.7 Г).

28,57 % (2 з 7) випадки мали ознаки серозних помірно диференційованих АКЯ: [Pan СК АЕ 1/ 3 (+), СА-125 (+), СК НМВ (-), СК 7 (+), СК 20 (-), p63 (-), p16^{INK4A} (+), WT-1 (+)], що також продемонстрували експресію p16^{INK4A} (рис. 5.8).

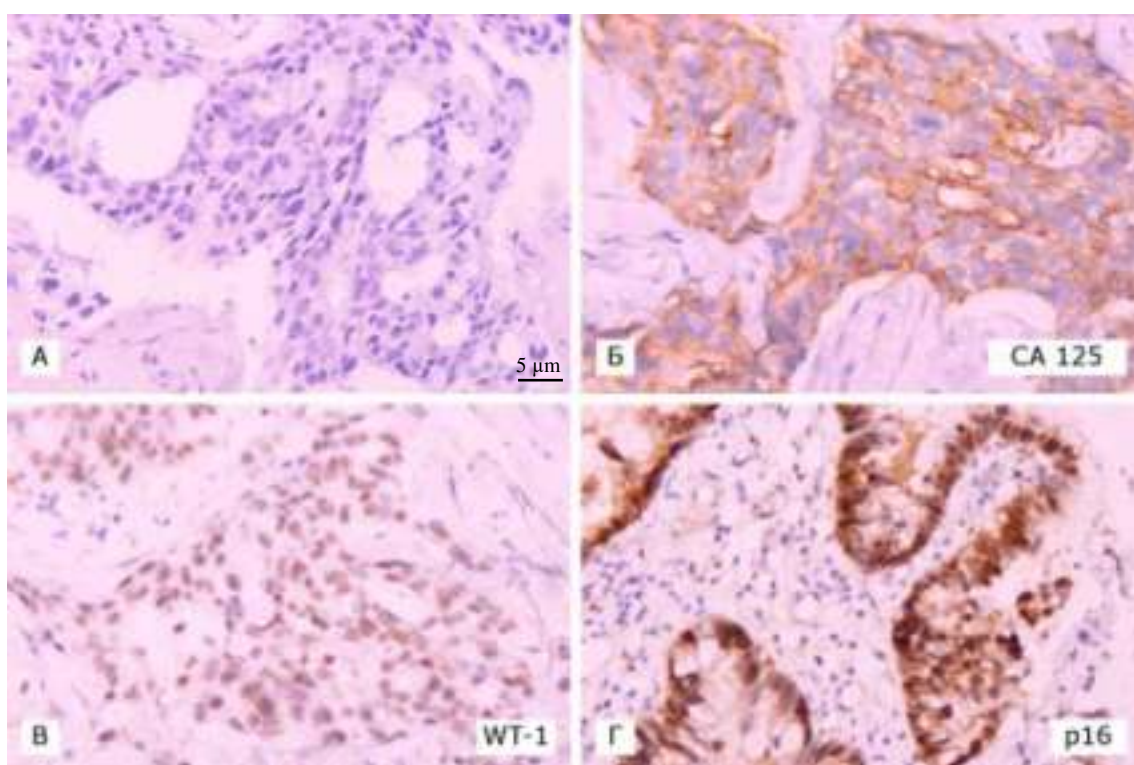


Рисунок 5.8 – Метастаз серозної аденокарциноми яєчника. А. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Б. Мембранна експресія СА-125, ІГХ з гематоксиліном Майєра. В. Інтрануклеарна експресія WT-1, ІГХ з гематоксиліном Майєра. Г. Позитивна ядерно-цитоплазматична реакція з p16^{INK4A}, ІГХ з гематоксиліном Майєра. Зб.: ×400.

Єдиний випадок p16^{INK4A} негативного метастазу в ПЛВ у жінок виявився карциномою з клітин Меркеля (ККМ), що мав специфічні риси дрібно-кругло-блакитної пухлини з імунофенотипом [Pan СК АЕ 1/3 (+), Vimentin (-

), CK HMW (-), CK 7 (-), CK20 (+), p63 (-), TTF-1 (-), p16^{INK4A} (-), CD117 (+/- в частині клітин), Chromogranin A (+/- слабка), Synaptophysin (+/-слабка)] (рис. 5.9).

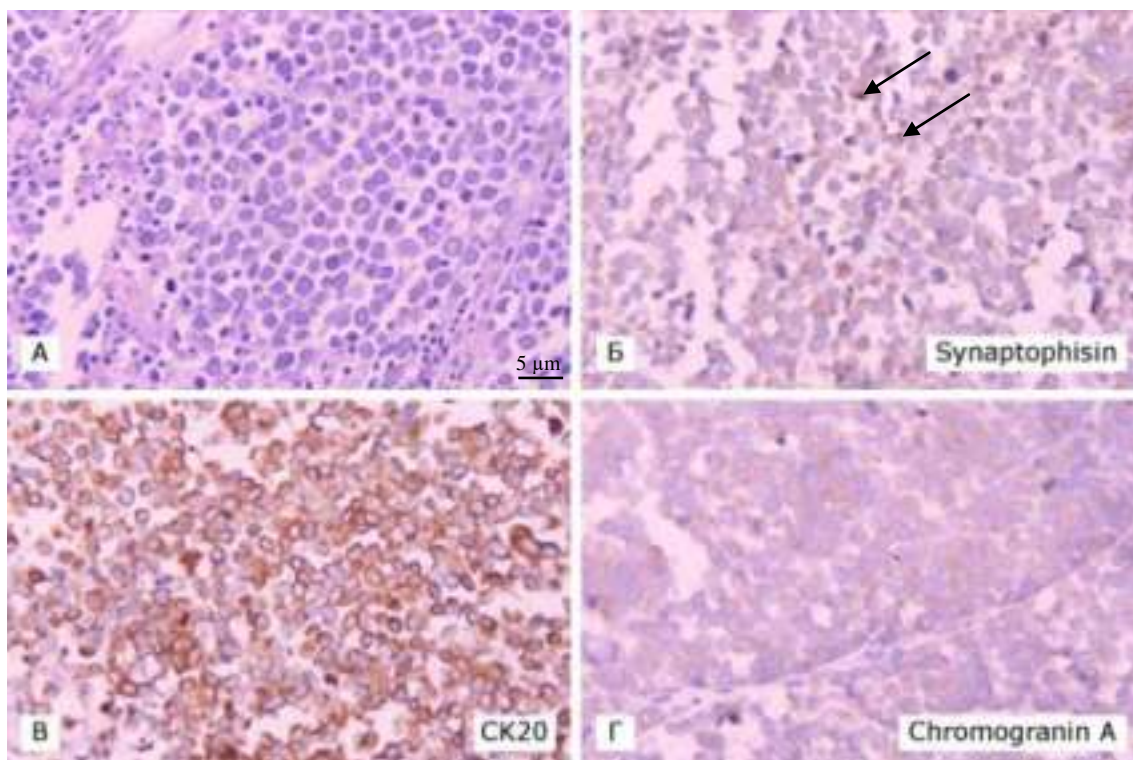


Рисунок 5.9 – Метастаз карциноми з клітин Меркеля. А. Формування трабекулярних структур, багато апоптотичних тілець, забарвлення гематоксилином і еозином. Б. Експресія Synaptophysin окремими клітинами в ділянках комплексу Гольджи (зазначено стрілками), ІГХ з гематоксилином Майєра. В. Цитоплазматична експресія CK 20, ІГХ з гематоксилином Майєра. Г. Слабка цитоплазматична експресія Chromogranin A, ІГХ з гематоксилином Майєра. Зб.: ×400.

Таким чином, 6 з 7 (85,71 %) спостережень [Pan CK AE 1/3 (+), Vimentin (-)] метастазів РНПЛ в ПЛВ у жінок виявили експресію онкопротеїну p16^{INK4A} і відношення до репродуктивної системи, що робить цей маркер дуже корисним в діагностиці «попередніх РНПЛ» цього фенотипу.

Відмінності гістологічної будови метастатичних карцином у жінок співпадали з різницею в МФМ показниках всіх фенотипів метастатичних пухлин (табл. 5.6). Показники площ та периметрів всіх варіантів метастатичних карцином були достовірно меншими за групу еталонну ПР шийки матки (обидва $p < 0,05$ відповідно).

Треба відмітити, що метастатичний ПР та ПР шийки матки також показали достовірну різницю за площею та периметром (обидва $p < 0,05$ відповідно), хоча мали найбільші ядра серед всіх груп порівняння, вірогідно через присутність в групі ПР шийки матки високо-, помірно- та низькодиференційованих гістологічних варіантів, тоді, як всі метастатичні ПР були представлені низькодиференційованими формами з меншими клітинами. З падінням ступеня диференціювання ядра клітин ПР зменшувались (табл. 5.6).

Таблиця 5.6 – Показники морфометричного дослідження ядер клітин спостережень метастатичних карцином пахових лімфатичних вузлів у жінок в програмі ImageJ, n, $M \pm SD$, $\mu\text{км}^2$, $\mu\text{км}$

Групи порівняння	Площа я/к ($\mu\text{км}^2$)	Периметр я/к ($\mu\text{км}$)	Коефіцієнт круглості я/к
Плоскоклітинний рак (1), (n=4)	55,5 \pm 9,93	29,7 \pm 3,42	0,79 \pm 0,05
Серозна АК яєчника (2), (n=2)	36,1 \pm 8,16	22,4 \pm 2,47	0,80 \pm 0,13
Карцинома з клітин Меркеля (3), (n=1)	40,6 \pm 7,35	24,7 \pm 2,01	0,81 \pm 0,05
Плоскоклітинний рак шийки майки, (n=7)	74,8 \pm 12,33	42,4 \pm 11,82	0,71 \pm 0,03
p*	$p(1)^{\&} < 0,05$ $p(2)^{\&} < 0,05$ $p(3)^{\&} < 0,05$	$p(1)^{\&} < 0,05$, $p(2)^{\&} < 0,05$, $p(3)^{\&} < 0,05$	$p(1)^{\&} > 0,05$, $p(2)^{\&} > 0,05$, $p(3)^{\&} > 0,05$

Примітка. n – кількість пухлин, $M \pm SD$ – середнє значення \pm стандартне відхилення, я/к – ядра клітин, & - групи порівняні U-критерієм Манна-Уїтні, * - порівняння варіантів метастатичних карцином проводили з характеристиками плоскоклітинних раків шийки матки.

5.3.2 Дослідження імуногістохімічних та морфометричних характеристик ізольованої пахові аденопатії у чоловіків

Імуногістохімічний профіль метастатичних карцином в ПЛВ чоловіків визначив дуже подібний розподіл пухлинних нозологій. А саме: 25,0 % (1 з 4) спостережень мав плоскоклітинне диференціювання без позитивних органо-

специфічних маркерів – [CK HMW (+), p63 (+), p16^{INK4A} (-), TTF-1 (-)] з найбільшим розміром ядер клітин (табл. 5.7); 25,0 % (1 з 4) – НЕК [Pan CK AE 1/3 (+), Chromogranin A (+), Synaptophysin (+)], що за своїми розмірами лише трохи перевищував розміри нормальних лімфоцитів (табл. 5.7); 25,0 % (1 з 4) – метастаз карциноми з клітин Меркеля – [Pan CK AE 1/3 (+) (парануклеарно), CK20 (+) (парануклеарно), CD117 (+/- в частині клітин), Chromogranin A (+/- дифузна але слабка), Synaptophysin (+/- дифузна але слабка)] з трохи вугловатими ядрами середнього розміру, які не збирались в «гнізда», а будували трабекулярні структури і відповідали параметрам категорії дрібно-кругло-синьо-клітинні пухлини (табл. 5.7);

Таблиця 5.7 – Показники морфометричного дослідження спостережень метастатичних карцином пахових лімфатичних вузлів у чоловіків в програмі ImageJ, n, M±SD, мкм², мкм

Групи порівняння	Площа я/к (мкм ²)	Периметр я/к (мкм)	Коефіцієнт круглості я/к
Плоскоклітинний рак (1), (n=1)	62,3±8,38	30,6±3,71	0,73±0,04
Нейроендокринний рак (2), (n=1)	18,7±2,07	16,5±1,13	0,84±0,05
Карцинома з клітин Меркеля (3), (n=1)	49,5±8,62	27,3±3,04	0,82±0,02
Семінома (4), (n=1)	47,6±4,62	32,6±4,71	0,84±0,08
Плоскоклітинний рак статевих органів, (n=6)	75,3±11,70	40,9±10,11	0,72±0,05
p*	p(1) ^{&} <0,05 p(2) ^{&} <0,05, p(3) ^{&} <0,05, p(4) ^{&} <0,05	p(1) ^{&} <0,05 p(2) ^{&} <0,05, p(3) ^{&} <0,05, p(4) ^{&} <0,05	p(1) ^{&} >0,05, p(2) ^{&} <0,05, p(3) ^{&} <0,05, p(4) ^{&} <0,05

Примітка. n – кількість пухлин, M±SD – середнє значення ± стандартне відхилення, я/к – ядра клітин, & - групи порівняні U-критерієм Манна-Уїтні, * - порівняння метастатичних пухлин проводили з ПР статевих органів.

25,0 % (1 з 4) – семінома – [Pan CK AE 1/3 (+), PLAP (+), CD117 (+)] з нейтрофільним інфільтратом між відокремленими клітинами середнього ро-

зміру (табл. 5.7). Всі спостереження, на відміну від жінок мали негативний статус за p16^{INK4A}, але подібну тенденцію до зменшення ядер клітин метастатичного ПР, порівняно із ПР статевих органів, внаслідок низького ступеня диференціювання (обидва **p<0,05**).

Резюме. З 7 метастазів карцином в ізольовані пахові лімфатичні вузли у жінок після ПГХ виявилось, що 6 (42,86 %) своєю первинною локалізацією завдяки p16^{INK4A} (+) фенотипу походили з репродуктивної системи (4 p16^{INK4A} (+) ПР шийки матки, 2 p16^{INK4A} (+) серозних АКЯ). Для порівняння, у чоловіків 50,0 % (2 з 4) мали походження з статевої системи (1 p16^{INK4A} (-) ПР та 1 семінома).

Таким чином, на сприятливий фенотип РНПЛ, як метастазування ПР в ПЛВ, приходять, в середньому, у жінок 57,14 % (4 з 7), у чоловіків 25,00 % (1 з 4) з імунофенотипом [СК НМВ (+), p63 (+), p16^{INK4A} (+ для жінок, - для чоловіків)] з найбільшим розміром ядер клітин ПР, порівняно з метастазами інших карцином. Метастатичні ПР у жінок і чоловіків мали достовірно менші площі та периметри ядер клітин (обидва **p<0,05** відповідно), порівняно із первинними ПР шийки матки у жінок і статевих органів у чоловіків, але подібні коефіцієнти круглості (всі p>0,05).

5.4 Низькодиференційована нейроендокринна карцинома

Тримаючись алгоритму діагностики «попередніх РНПЛ» було відібрано 107 примірників нейроендокринних пухлин (НЕП) різного ступеня диференціювання (G1-G3) без первинної локалізації, які відповідали «епітеліальній» морфології та імунофенотипу [Pan СК AE1/3 (+), Vimentin (-), CD45 (-), S100 (+/-) і/або НМВ45 (-)] та обов'язкове забарвлення маркерами [Chromogranin A (+/-) і/або Synaptophysin (+/-) і/або CD56 (+)], що доводило власне нейроендокринне походження, але не первинну локалізацію.

5.4.1 Визначення імуногістохімічних та морфометричних характеристик нейроендокринних пухлин без первинних локалізацій

Для з'ясування походження була проаналізована вторинна ланка органо-специфічної ІГХ діагностики (легенів [СК 7 (+), TTF-1 (+)], підшлункової залози [РАХ-8 (+), TTF-1 (-)], товстої кишки [CDX-2 (+)], молочної залози [СК 7 (+), ER (+)], передміхурової залози [AR (+)], ККМ [СК 20 (+ dot like), TTF-1 (-)]). За ІГХ відокремились 5 підгруп НЕП, які продемонстрували відмінності за віком та гендерним показником (табл. 5.8).

Таблиця 5.8 – Розподіл імунофенотипів нейроендокринних пухлин після другої імуногістохімічної панелі за статтю та віком, n (%), M±SD

Імунофенотип метастазу нейроендокринної пухлини, n (%)	Стать n (%)	Вік M±SD, роки
[СК 7(+), TTF-1(+)] нейроендокринні пухлини легенів 37 (34,57 %)	Ж 7 з 37 (18,91 %)	54,57±11,25
	Ч 30 з 37 (81,08 %)	60,67±11,15
[СК 20 парануклеарно (+), TTF-1(-)] карциноми з клітин Меркеля 6 (5,61 %)	Ж 2 з 6 (33,33 %)	58,34±10,32
	Ч 4 з 6 (66,67 %)	68,75±12,18
CDX-2(+) нейроендокринні пухлини товстої кишки 8 (7,48 %)	Ж 3 з 8 (37,50 %)	62,33±6,50
	Ч 5 з 8 (62,50 %)	47,80±5,17
[СК 20(-), СК 7(-), TTF-1(-), РАХ-8(-)] - інші нейроендокринні пухлини без органоспецифічних реакцій 50 (46,73 %)	Ж 24 з 50 (48,00)	60,21±14,13
	Ч 26 з 50 (52,00)	60,00±9,22
[СК 7(+), ER(+)] НЕП молочної залози 6 (5,61 %)	Ж 6 з 6 (100,00)	52,50±6,59

Примітка. M±SD – середнє значення ± стандартне відхилення, ж – жінки, ч – чоловіки, НЕП – нейроендокринна пухлина.

Аналіз за віком показує, що наймолодшими є жінки з НЕП молочної залози, а наймолодші чоловіки мали НЕП товстої кишки, навпаки жінки цього імунофенотипу були найстаршими, але всі в діапазоні 45 – 70 років.

Згідно таблиці 5.8, перший імунофенотип з [СК 7 (+) / TTF-1 (+)] – НЕП вірогідно з легенів (рис. 5.10 А – Г.) в 13 з 37 (35,13 %) випадків було знайдено в легенях (первинний вузол, або метастаз в межах легенів), в 9 з 37 (24,32 %) – шийні лімфатичні вузли, в 5 з 37 (13,51 %) – НЕП були знайдені в надключичних та / або піхвових лімфатичних вузлах, 2 – в печінці, 2 – в наднирниках, 2 – в головному мозку, та по 1 локалізації (нирка, шкіра, шлунок).

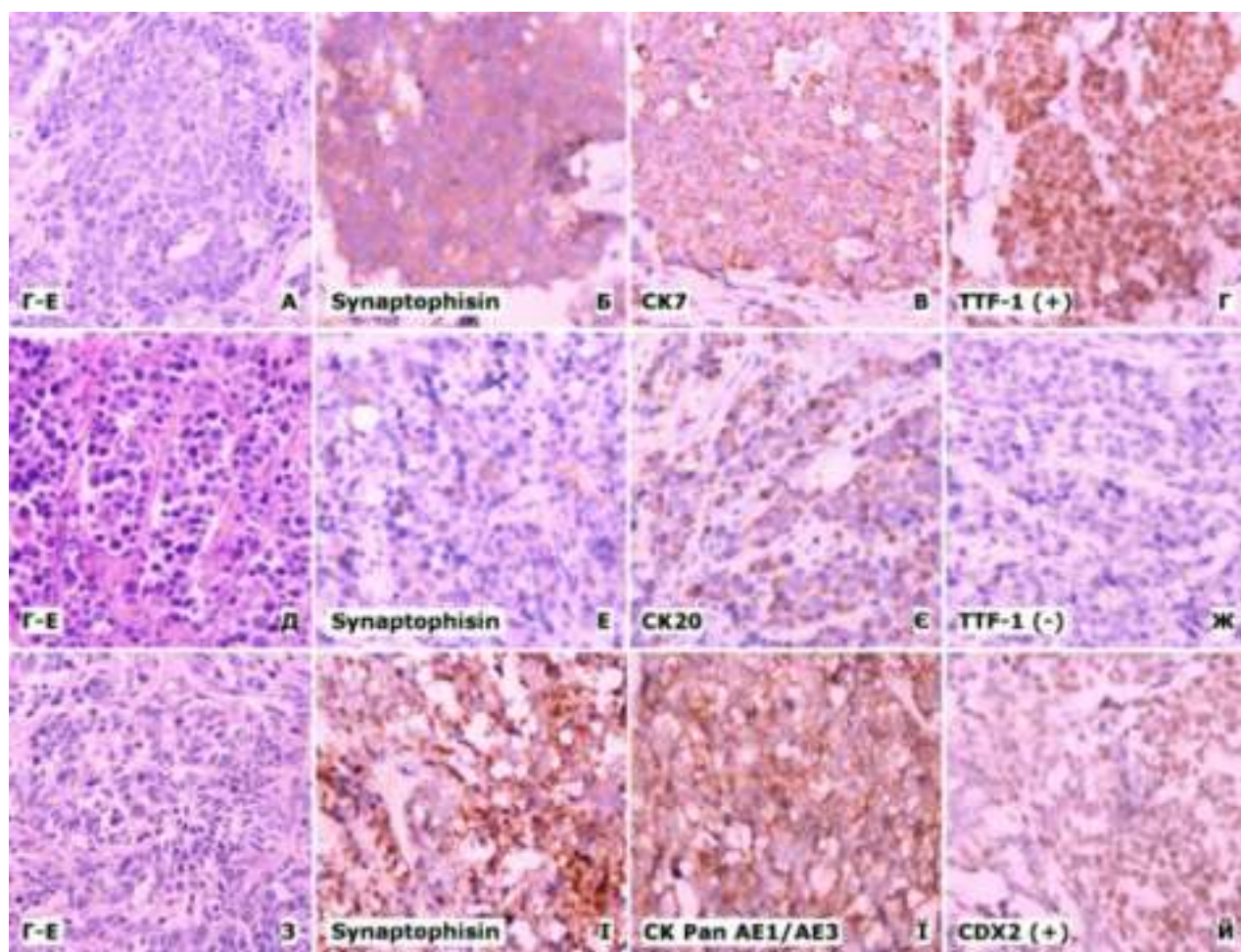


Рисунок 5.10 – Метастаз НЕК легенів (А – Г): А. Забарвлення гематоксином і еозином. Б. Помірна дифузна експресія Synaptophysin. В. Цитоплазматична експресія СК 7. Г – Інтрануклеарна експресія TTF-1 на рівні 82 %. Б – В. ІГХ з гематоксином Майєра. Зб.: $\times 400$. Метастаз карциноми з клітин Меркеля (Д – Ж). Д. Забарвлення гематоксином і еозином. Е. Слабка експресія Synaptophysin поодиноких клітин. Є. Парануклеарна реакція з СК 20. Ж. Негативна експресія TTF-1. Е – Ж. ІГХ з гематоксином Майєра. Зб.: $\times 400$. Дрібноклітинна НЕК товстої кишки (З – Й): З. Забарвлення гематоксином і еозином. І. Цитоплазматична експресія Synaptophysin. Ї. Інтенсивна експресія Pan СК AE1/3. Й – Інтрануклеарна експресія CDX-2 на рівні 74 %. І – Й. ІГХ з гематоксином Майєра. Зб.: $\times 400$.

З 37 випадків НЕП легенів 6 виявились типовими карциноїдами (G1) з проліферативною активністю за Ki-67 до 5 % (група 1) (табл. 5.9). Низькодиференційовані НЕК (G3) [СК 7 (+), TTF-1 (+)] фенотипу, що мали показники Ki-67 більше 20 %, включали обидва варіанта диференціювання дрібно- та великоклітинні НЕК (група 2). Отриману тенденцію при порівнянні груп (1) і (2) – чим нижче ступінь диференціювання НЕП, тим вище проліферативна активність – можна достовірно використовувати як діагностичний критерій ($p < 0,05$).

Таблиця 5.9 – Показники морфометричного дослідження та проліферативної активності ядер клітин [СК 7(+) / TTF-1(+)] – нейроендокринних пухлин легенів в програмі ImageJ, n, M±SD, мкм², мкм, %

Групи порівняння	Площа я/к (мкм ²)	Периметр я/к (мкм)	Коефіцієнт круглості я/к	ІП за Ki-67, M±SD, %
Високодиференційовані НЕП, G1 (1), (n=6)	11,32±1,28	12,99±1,06	0,79±0,11	2,01±0,02
Низькодиференційовані НЕК, G3 (2), (n=31)	25,29±4,99	18,86±1,89	0,74±0,08	56,58±18,13
Еталон МФМ (звичайні лімфоцити), (n=10)	16,74±2,69	15,99±1,54	0,75±0,10	
p*	p<0,05 , p(1) >0,05 [#] p(2) >0,05 [#]	p>0,05, p(1) >0,05 [#] p(2) >0,05 [#]	p>0,05, p(1) >0,05 [#] p(2) >0,05 [#]	p<0,05

Примітка. n – кількість пухлин, M±SD – середнє значення ± стандартне відхилення, я/к – ядра клітин, * - групи порівняні t-критерієм Стюдента, ІП – індекс проліферації за Ki-67, НЕП – нейроендокринна пухлина, НЕК – нейроендокринна карцинома, [#] - порівняння групи (1) та групи (2) з розмірами звичайних лімфоцитів лімфатичного вузла.

Було також проведене порівняння МФМ показників між НЕП (G1) та низькодиференційованими НЕК (G3) легенів, та, окремо кожного варіанту з еталоном МФМ дослідження – ЗЛ (табл. 5.9). Знайдено тільки статистично достовірну різницю між площею груп (1) та (2) ($p < 0,05$), але не з розмірами ЗЛ (всі $p > 0,05$). Це обумовлює складність диференційної діагностики НЕП

легенів, у зв'язку з відношенням цих імунотипів до дрібно-кругло-синьо-клітинних пухлин.

Другий імунотип, що був відокремлений із загальної кількості метастатичних карцином як РНПЛ, загальною кількістю 6, мав характеристики карциноми з клітин Меркеля [Pan CK AE1/3 (+) парануклеарно, Synaptophysin (+/-) і/або Chromogranin A (+/-), CK 20 (+) парануклеарно, TTF-1 (-)], що загалом вражав периферичні лімфатичні вузли (шийні, пахові, малого тазу та аксиллярні) (рис. 5.10 Д – Ж). Розміри клітин цього імунотипу приблизно в 2 рази були більше площі та периметру звичайних лімфоцитів (обидва $p < 0,05$) (табл. 5.10). До того ж, треба відзначити дуже високу проліферативну активність карциноми з клітин Меркеля (практично на рівні лімфом), що може бути використано в якості диференційної ознаки.

Таблиця 5.10 – Показники морфометричного дослідження ядер клітин та проліферативної активності метастазів карцином з клітин Меркеля в програмі ImageJ, n, M±SD, мкм², мкм, %

Групи порівняння	Площа я/к (мкм ²)	Периметр я/к (мкм)	Коефіцієнт круглості я/к	ІП за Ki-67, %
Метастаз карцином з клітин Меркеля, (n=6)	35,86± 5,93	25,45± 2,09	0,80± 0,06	78,58± 18,13
Еталон МФМ (звичайні лімфоцити), (n=10)	16,74± 2,69	15,99± 1,54	0,75± 0,09	
p	$p^{\&} < 0,05$	$p^{\&} < 0,05$	$p^{\&} > 0,05$	

Примітка. n – кількість пухлин, M±SD – середнє значення ± стандартне відхилення, я/к – ядра клітин, & - групи порівняні U-критерієм Манна-Уїтні, ІП – індекс проліферації.

Представники імунотипу НЕП товстої кишки (рис. 5.10 З – Й) також мали відмінності за ступенем диференціювання. Високодиференційована НЕП (G1) з ІП за Ki-67 до 2 % була поєднана в групу (1) з високодиференційованою НЕК (G2) з ІП за Ki-67 до 20 % (табл. 5.11). Низькодиференційовані НЕК (G3) з ІП за Ki-67 більше 20 % включали дрібно- та великоклітинні варіанти, що сформували групу (2) (табл. 5.11).

За розподілом локалізації ураження вони були розташовані в 4 спостереженнях – товста кишка (первинна локалізація), 3 – тонка кишка (метастаз), 1 – печінка (метастаз). Очікувано знайдено достовірну різницю між проліферативною активністю групи (1) та групи (2) ($p < 0,05$). Також, знайдено різницю за площею між групами НЕП з (G1, G2) та НЕК з (G3) товстої кишки ($p < 0,05$), а також між площею низькодиференційованих НЕК (G3) та ЗЛ ($p < 0,05$).

Таблиця 5.11 – Показники морфометричного дослідження та проліферативної активності [Pan CK AE 1/3 (+), CDX-2(+)] – нейроендокринних пухлин фенотипу товстої кишки в програмі ImageJ, n, M±SD, мкм², мкм, %

Групи порівняння	Площа я/к (мкм ²)	Периметр я/к (мкм)	Коефіцієнт круглості я/к	ІП за Ki-67, %
Високодиференційовані НЕП і НЕК товстої кишки, G1 і G2 (1), (n=2)	19,25±2,79	16,45±1,29	0,82±0,05	3,01±0,15
Низькодиференційовані НЕК товстої кишки G3 (2), (n=6)	29,63±5,59	20,77±2,16	0,81±0,07	44,91±3,82
Еталон МФМ (звичайні лімфоцити), (n=10)	16,74±2,69	15,99±1,54	0,75±0,09	
p	$p^{\&} < 0,05^*$, $p(1)^{\&} > 0,05^{\#}$ $p(2)^{\&} < 0,05^{\#}$	$p^{\&} > 0,05^*$, $p(1)^{\&} > 0,05^{\#}$ $p(2)^{\&} > 0,05^{\#}$	$p^{\&} > 0,05^*$, $p(1)^{\&} > 0,05^{\#}$ $p(2)^{\&} > 0,05^{\#}$	$p^{\&} < 0,05^*$

Примітка. n – кількість пухлин, M±SD – середнє значення ± стандартне відхилення, я/к – ядра клітин, & - групи порівняні U-критерієм Манна-Уїтні, ІП – індекс проліферації за Ki-67, НЕП – нейроендокринна пухлина, НЕК – нейроендокринна карцинома, * - порівняння між собою групи (1) та групи (2), # - порівняння з розмірами звичайних лімфоцитів.

Фенотип метастазів НЕП, що був представлений лише у жінок, мав ознаки раку молочної залози із [CK 7 (+), Chromogranin A (+/-) і/або Synaptophysin (+/-), ER (+) і/або PGR (+)], і був представлений виключно карциномами низького ступіня диференціації (G3), що знайшло відображення в

МФМ показниках (табл. 5.12). За площею низькодиференційовані НЕП молочної залози достовірно були більшими за ЗЛ ($p < 0,05$).

Таблиця 5.12 – Показники морфометричного дослідження та проліферативної активності ядер клітин [СК 7 (+) / ER (+)] нейроендокринних пухлин молочної залози в програмі ImageJ, n, M±SD, мкм², мкм, %

Групи порівняння	Площа я/к (мкм ²)	Периметр я/к (мкм)	Коефіцієнт круглості я/к	ІП за Ki-67, %
Низькодиференційовані НЕК МЗ, G3, (n=6)	28,18±5,69	20,25±2,14	0,75±0,11	48,52±4,74
Еталон МФМ (звичайні лімфоцити), (n=10)	16,74±2,69	15,99±1,54	0,75±0,09	
p	$p^{\&} < 0,05$	$p^{\&} > 0,05$	$p^{\&} > 0,05$	

Примітка. n – кількість пухлин, M±SD – середнє значення ± стандартне відхилення, я/к – ядра клітин, & - групи порівняні U-критерієм Манна-Уїтні, ІП – індекс проліферації за Ki-67, НЕК – нейроендокринна карцинома.

Без наявності органоспецифічних маркерів [Chromogranin A (+/-) і/або Synaptophysin (+/-) і/або CD56 (+) / СК 20 (-) / СК 7 (-) / TTF-1 (-) / PAX-8 (-)] виявилось 46,73 % випадків НЕП (50 із 107); з яких 19 вискодиференційованих пухлин (38 %) – 7 з G1 і ІП за Ki-67 до 2 % та 12 з G2 і ІП за Ki-67 до 20 %, а також 31 низькодиференційованих НЕК (G3) (табл. 5.13).

Цікаво, що 19 випадків були метастазами НЕК в печінку, 8 метастазів НЕК в шлунок (? первинна локалізація), 2 – в підшлункову залозу (? первинна локалізація PAX-8 (-) варіанту) та інші – метастази в лімфатичні вузли та очеревину (непапілярний канцероматоз).

Знайдено достовірну різницю між проліферативною активністю групи (1) та групи (2) НЕП без відомої первинної локалізації ($p < 0,05$). Також, знайдено різницю між групами високо- (G1 і G2) та низькодиференційованих (G3) НЕП без відомої первинної локалізації за площею ($p < 0,05$) й коефіцієнтом круглості ($p < 0,05$), а також між площею низькодиференційованих НЕК (G3) та ЗЛ ($p < 0,05$).

Таблиця 5.13 – Показники морфометричного дослідження та проліферативної активності ядер клітин нейроендокринних пухлин без відомої первинної локалізації в програмі ImageJ, n, M±SD, мкм², мкм, %

Групи порівняння	Площа я/к (мкм ²)	Периметр я/к (мкм)	Коефіцієнт круглості я/к	ІП за Ki-67, %
Високодиференційовані НЕП і НЕК, G1 і G2 (1), (n=19)	18,7±3,09	16,3±1,29	0,81±0,11	13,0±0,72
Низькодиференційовані НЕК, G3 (2), (n=31)	35,0±6,81	24,9±2,34	0,71±0,82	35,4±17,35
Еталон МФМ (звичайні лімфоцити), (n=10) [#]	16,7±2,69	15,9±1,54	0,75±0,09	
p	p* <0,05, p(1)* >0,05 [#] p(2)* <0,05[#]	p*=0,089, p(1)* >0,05 [#] p(2)* >0,05 [#]	p* <0,05, p(1)* >0,05 [#] p(2)* >0,05 [#]	p* <0,05

Примітка. n – кількість пухлин, M±SD – середнє значення ± стандартне відхилення, я/к – ядра клітин, * - групи порівняні t-критерієм Стьюдента, ІП – індекс проліферації за Ki-67, НЕП – нейроендокринна пухлина, НЕК – нейроендокринна карцинома, [#] - група (1) та група (2) порівняні з розмірами звичайних лімфоцитів.

Резюме. Аналіз результатів ІГХ в 107 зразках метастазів нейроендокринних пухлин (НЕП) невідомого походження виявив 5 груп, 4 з яких через позитивні реакції з органоспецифічними маркерами визначились як НЕП з легенів (37 з 107; 34,58 %), товстої кишки (8 з 107; 7,5 %), молочної залози (6 з 107; 5,6 %) та 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 сприятливий фенотип РНПЛ, що мали достовірно більший індекс проліферації за t-критерієм Стьюдента ніж НЕП з G1 та G2 (35,4±17,35 проти 13,0±0,72; **p<0,05**).

МФМ дослідження зразків НЕП визначило найбільшими за параметрами площ та периметрів ядер низькодиференційованих НЕК, G3 (дрібно- та ве-

ликокклітинні варіанти разом) з невизначеними органоспецифічними маркерами й ККМ. Відмінність між ними мала місце в експресії нейроендокринних маркерів Chromogranin A і/або Synaptophysin, що в випадках ККМ демонстрували dot-like парануклеарну реакцію з CK 20 і/або Pan CK AE1/3 і високий ПП (на рівні лімфом), на відміну від НЕП відомих локалізацій.

Індекс проліферації має велике значення для визначення ступеня диференціювання нейроендокринних пухлин: визначено, що в низькодиференційованих НЕК об'єктивно більшими були параметри ядер клітин та проліферативна активність всіх груп НЕП (всі $p < 0,05$).

5.4.2 Особливості TTF-1 позитивних пухлин легенів, порівняння морфометричних характеристик низькодиференційованих нейроендокринних карцином невідомого походження з первинними дрібноклітинними карциномами легень

На етапі відбору дрібноклітинних карцином всі спостереження пухлин легенів 36 хворих (26 чоловіків і 10 жінок) були перевірені щодо «епітеліальної» будови паренхіми та імунофенотипу [Pan CK AE1/3 (+), TTF-1 (+), Vimentin (-/+), CD45 (-), S100 і/або HMB45 (-)] з метою визначення пухлин епітеліального легеневого походження. Вторинна ІГХ панель маркерів з [CK HMW, p63, CK 7, CK 20, Chromogranin A, Synaptophysin, Ki-67] (останній маркер для визначення індексу проліферації) допомогла розділити відібрані випадки на 6 підгруп за фенотипами і ступенем диференціювання (табл. 5.14).

Цікаво, що 4 з них включали нейроендокринні пухлини, це доводить подібна експресія сукупності маркерів, а саме: [CK HMW (-), p63 (-), CK7(+), CK20 (-), TTF-1 (+), Chromogranin A (+) і / або Synaptophysin (+)]. Між собою вони розрізнялись гістологічною будовою пухлинної тканини і активністю проліферації (табл. 5.14).

В таблиці 5.14 для розподілу за фенотипами брали до уваги гістологічну будову, експресію цитокератинів та нейроендокринних маркерів (необхід-

ні дані для класифікації пухлин легенів), стать. Аналізувались показники середнього віку та індекс проліферації за Ki-67.

Таблиця 5.14 – Розподіл первинних пухлин легенів пацієнтів за статтю, віком та проліферативною активністю кітин, n, (%), M±SD

№	Фенотип карциноми легенів	n	Стать n=36, (%)	Середній вік, M±SD, роки	ІІ за Ki-67, %
1	Плоскоклітинний рак легенів [СК HMW+, p63+, СК 7+, СК 20-, TTF-1+, Chromogranin A-, Synaptophysin-]	3	Ж 2 (5,5)	52,5±14,8	43,3±5,4
			Ч 1 (2,8)	65,0	
2	Аденокарцинома легенів [СК HMW-, p63-, СК 7+, СК 20-, TTF-1+, Chromogranin A-, Synaptophysin-]	5	Ж 1 (20,0)	65,0	23,8±20,6
			Ч 4 (80,0)	60,5±3,3	
3	Типовий карциноїд, G1 [СК HMW-, p63-, СК 7+, СК 20-, TTF-1+, Chromogranin A+, Synaptophysin+]	6	Ж 4 (66,7)	54,0±16,9	2,01±0,02
			Ч 2 (33,3)	61,0±11,3	
4	Атиповий карциноїд, G2 [СК HMW-, p63-, СК 7+, СК 20-, TTF-1+, Chromogranin A+, Synaptophysin+]	2	Ч 2 (100,0)	47,5±9,2	10,0±1,4
5	Дрібноклітинна нейроендокринна карцинома, G3 [СК HMW-, p63-, СК 7+, СК 20-, TTF-1+, Chromogranin A+, Synaptophysin+]	17	Ж 3 (17,7)	53,3±3,8	49,1±14,6
			Ч 14 (82,3)	61,0±10,4	
6	Великоклітинна нейроендокринна карцинома, G3 [СК HMW-, p63-, СК 7+, СК 20-, TTF-1+, Chromogranin A+, Synaptophysin+]	3	Ч 3 (100,0)	55,0±14,7	67,2±11,1

Примітка. n – кількість пухлин, M±SD – середнє значення ± стандартне відхилення, ж – жінки, ч – чоловіки, ІІ – індекс проліферації за Ki-67.

Цікаво, що в таких нозологічних одиницях як атиповий карциноїд та велико-клітинна НЕК серед пацієнтів були тільки чоловіки., в інших карциномах чоловіків було більше, можливо це є відображенням канцерогенезу

епітеліальних пухлин легенів, виникнення яких фахівці пов'язують із палінням, вдиханням канцерогенних речовин виробництва, урбанізацією. Серед особливостей великоклітинних НЕК можна назвати ще найбільшу серед всіх представлених епітеліальних пухлин легенів проліферативну активність за Ki-67, що може бути одним з діагностичних критеріїв верифікації TTF-1 позитивних метастазів (табл. 5.14).

Нижні 4 строки таблиці 5.14 з НЕП від G1 до G3, продемонстрували однаковий імунофенотип, але, як було сказано вище, мали відмінності в морфології (рис. 5.11 А, Г, Ж).

Дрібноклітинні НЕК (17 з 36; 47,22 %) характеризували розеткоподібними й трабекулярними патернами клітин, ядра яких без видимих ядерець містили гранулярний хроматин типу «сіль з перцем». Привертала увагу чисельні апоптотичні тільця й дифузно розкидані ділянки некрозів. Дрібноклітинні НЕК завжди мали велику частку клітин з експресією TTF-1+ (до 85 %), але показували деяку мінливість в забарвленні CK7 та/ або Synaptophysin за умов втрати диференціювання (рис. 5.11 Ж – Ї).

Велико-клітинна НЕК (3 з 36; 8,33 %), порівняно з дрібноклітинними НЕК демонструвала більші площі та периметри ядер, що відрізнялись наявністю контрастних ядерець, а також широкими некротичними полями пухлинної тканини. Часткова втрата експресії маркеру Synaptophysin в великоклітинних НЕК робила їх схожими на ККМ, але допомагав великий відсоток інтрануклеарних реакцій з маркером TTF-1+ (до 78 %). Фрагменти паренхіми з будовою ПР та / або АК рідко зустрічались в тканині великоклітинних НЕК, але були недостатньо сформованими для підтвердження змішаних варіантів НЕК (< 10 % тканини карциноми.)

Типовий і атиповий карциноїди легенів демонстрували майже однакову будову та імунофенотип, зокрема ІІІ. Діагностичним критерієм для забарвлення Г-Е слугувала кількість мітозів, що значно збільшувалась в атипових варіантах до 9 в 10 полях зору при $\times 400$ (рис. 5.11).

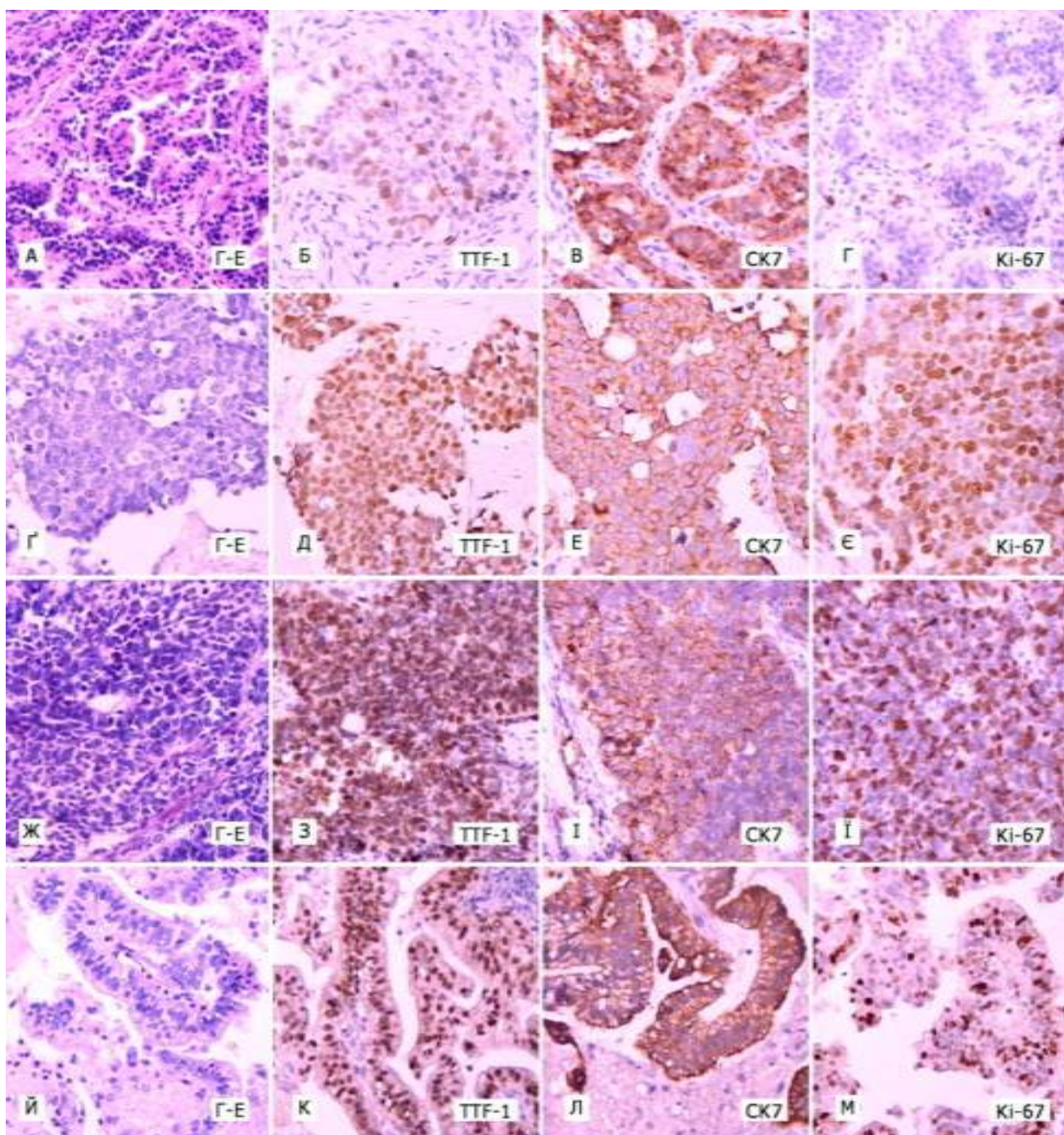


Рисунок 5.11 – Варіанти нейроендокринних пухлин легенів.

Типовий карциноїд легенів (А – Г). А. Забарвлення гематоксиліном і еозином, Б – Г: ІГХ з гематоксиліном Майєра, Ki-67 на рівні 2 %. Зб.: ×400.

Атиповий карциноїд легенів (Г – Є). Д. Забарвлення гематоксиліном і еозином, Е – Ж: ІГХ з гематоксиліном Майєра, Ki-67 на рівні 57 %. Зб.: ×400.

Дрібноклітинний рак легенів (Ж – Ї). З. Забарвлення гематоксиліном і еозином, І – Ї: ІГХ з гематоксиліном Майєра, Ki-67 на рівні 62 %. Зб.: ×400.

Високодиференційована папілярна АК легенів (Й – М). К. Забарвлення гематоксиліном і еозином, Л – Н: ІГХ з гематоксиліном Майєра, Ki-67 на рівні 27 %. Зб.: ×400

МФМ дослідження мікрофотографій 6 окремих нозологічних одиниці за класифікацією пухлин легенів в програмі ImageJ продемонструвало різницю трьох з них за результатами вимірювання площі, двох за периметром і тільки однієї за коефіцієнтом круглості, в порівнянні з розмірами звичайних лімфоцитів (табл. 5.15).

Таблиця 5.15 – Показники морфометричного дослідження ядер клітин [СК 7 (+) / TTF-1 (+)] – первинних пухлин легенів в програмі ImageJ, n, M±SD, мкм², мкм, %

Фенотип первинної [СК 7+, TTF-1+] пухлини легенів	Площа я/к (мкм ²)	Периметр я/к (мкм)	Коефіцієнт круглості я/к
ПР легенів (1), (n=3)	90,57±24,80	37,30±8,94	0,70±0,06
АК легких (2), (n=5)	30,88±6,98	23,10±3,54	0,53±0,10
Типовий карциноїд, G1 (3), (n=6)	12,81±1,25	13,61±2,52	0,75±0,02
Атиповий карциноїд, G2 (4), (n=2)	24,12±3,15	14,71±2,51	0,78±0,02
Дрібноклітинна НЕК, G3 (5), (n=17)	21,46±5,15	18,53±2,08	0,72±0,05
Великоклітинна НЕК, G3 (6), (n=3)	55,69±12,08	30,85±3,79	0,68±0,02
Еталон МФМ (звичайні лімфоцити), (n=10)*	16,74±2,69	15,99±1,54	0,75±0,09
p&	p(1) <0,05, p(2) <0,05, p(3) >0,05, p(4) >0,05, p(5) >0,05, p(6) <0,05.	p(1) <0,05, p(2) >0,05, p(3) >0,05, p(4) >0,05, p(5) >0,05, p(6) <0,05.	p(1) >0,05, p(2) <0,05, p(3) >0,05, p(4) >0,05, p(5) >0,05, p(6) >0,05.

Примітка. n – кількість пухлин, M±SD – середнє значення ± стандартне відхилення, я/к – ядра клітин, & - групи порівняні U-критерієм Манна-Уїтні, ПР – плоскоклітинний рак, АК – аденокарцинома, НЕК – нейроендокринна карцинома, * - порівняння всіх груп карцином легенів проводили з розмірами звичайних лімфоцитів лімфатичного вузла.

Плоскоклітинні раки легенів продемонстрували найбільші значення площі та периметру ядер, порівняно з іншими типами карцином легенів (табл. 5.15). При порівнянні ПР з розмірами ЗЛ, з'ясувалось що вони більше приблизно в 5 разів за «площею» та в 2 рази за «периметром»; за формою ядра клітин ПР легенів ближче до овалу але досить поліморфні полігональною.

Великоклітинна НЕК та АК легенів посіли за розмірами клітин друге та третє місце відповідно та за коефіцієнтом круглості мали овоїдні або полігональні ядра (всі $p < 0,05$) (табл. 5.15).

Інші три підгрупи нейроендокринних карцином були дуже подібні між собою з найбільшим ядрами в дрібноклітинній нейроендокринній карциномі (табл. 5.15).

Була оцінена корисність ІГХ маркерів, гістологічних особливостей та морфометричних показників в диференційній діагностиці первинних ТТФ-1 (+) пухлин легенів. Перша підгрупа плоскоклітинних карцином за своїми ІГХ фенотипом [СК НМВ (+), p63 (+), Chromogranin A (-), Synaptophysin (-)], гістологічними особливостями (щільні епітеліальні контакти, ознаки кератинізації), морфометричними показниками (великі, полігональні ядра) та метастатичним розповсюдженням в регіональні лімфатичні була дуже подібна до плоскоклітинних карцином голови та шиї, з якими має бути проведена ретельна диференційна діагностика, у випадку невідомого первинного джерела.

В літературі повідомляється про частоту легеневих злоякісних захворювань у пацієнтів з раком голови та шиї в межах від 4,5 % до 14 %, до того ж синхронні злоякісні захворювання легенів найчастіше асоціюються з первинними пухлинами саме гортані й глотки . Первинний плоскоклітинний рак легені важко відрізнити від такої метастатичної карциноми голови та шиї. Відсоток позитивного ТТФ-1 відмічають до 10 % плоскоклітинних карцином легенів, але він завжди негативний при раці голови та шиї. Тож у цьому випадку ТТФ-1 є корисним, але йому не вистачає чутливості.

Аденокарцинома легенів представляє найбільшу складність для діагностики метастатичних варіантів аденокарцином з інших локалізацій завдяки

типовій гістології з муцинозним компонентом, але 3 ІГХ маркери - ТТФ-1 (+), СК 7 (+) і СК 20 (-) можуть бути корисними в визначенні саме первинного джерела як легені (рис. 5.11 К – Н). За даними авторів, 72 % легеневих аденокарцином є позитивним для ТТФ-1. Але треба враховувати, що невелика частка муцинозних бронхо-альвеолярних карцином легенів також імітують метастази з первинного джерела із ШКТ (CDX-2 – позитивні).

ІГХ панель з маркерів Chromogranin A, Synaptophysin, нейрофіламенти, CD56, білок S-100 є корисними в визначенні нейроендокринної природи ТТФ-1+ пухлин легенів. Але між собою 4 підгрупи (типовий карциноід, атипівий карциноід дрібноклітинна та велико-клітинна НЕК) можуть бути розрізненні за морфометричними показниками та гістологічною картиною (наявність ядерця, некрозів та кількість мітозів на 10 полів зору при $\times 400$).

Диференційна діагностика з іншими нейроендокринними пухлинами викликає складності в верифікації метастатичної карциноми з клітин Меркеля. За розмірами останні займають проміжне положення між дрібноклітинною та велико-клітинною нейроендокринними карциномами легенів, але карциноми з клітин Меркеля є строго позитивними на СК 20 і негативні - для ТТФ-1. Складність виникає у випадках ТТФ-1 – негативних пухлин легенів, але набір з трьох ІГХ маркерів: СК 20, нейрофіламенти та ТТФ-1, є корисним для розрізнення між ККМ та дрібноклітинним раком легенів.

Таким чином, отримані морфологічні, ІГХ та МФМ характеристики первинного дрібноклітинного нейроендокринного раку легенів можна використовувати як еталон для порівняння з фенотипами метастатичних низькодиференційованих НЕК в якості фенотипів клініко-морфологічного синдрому «РНПЛ» для з'ясування доцільності проведення подібної терапії (табл. 5.16).

Аналізуючи дані таблиці 5.16 отримуємо достовірну відмінність первинних дрібноклітинних карцином легенів тільки з фенотипами метастатичних низькодиференційованих НЕК (G3) без органоспецифічних ознак в якості фенотипу РНПЛ та метастазами карцином з клітин Меркеля за параметром «площа» (обидва $p < 0,05$ відповідно) та проліферативною активністю (обид-

ва $p < 0,05$ відповідно). Подібність МФМ характеристик інших фенотипів метастатичних низькодиференційованих НЕК робить ключовим в діагностиці їх ІГХ профіль

Таблиця 5.16 – Показники морфометричного дослідження та проліферативної активності ядер клітин низькодиференційованих нейроендокринних пухлин без відомої первинної локалізації в порівнянні з первинними дрібноклітинними раками легень в програмі ImageJ, n, $M \pm SD$, $\mu\text{м}^2$, $\mu\text{м}$, %

	Групи порівняння	Площа я/к ($\mu\text{м}^2$)	Периметр я/к ($\mu\text{м}$)	Коефіцієнт круглості я/к	ІП за Кі-67, %
1	Метастатичні низькодиференційовані НЕК (G3) легень, (n=31)	25,29±4,99	18,86±1,89	0,74±0,08	56,58±18,13
2	Метастатичні низькодиференційовані НЕК (G3) товстої кишки, (n=6)	29,63±5,59	20,77±2,16	0,81±0,07	44,91±3,82
3	Метастатичні низькодиференційовані НЕК (G3) МЗ, (n=6)	28,18±5,69	20,25±2,14	0,75±0,11	48,52±4,74
4	Метастатичні низькодиференційовані НЕК (G3) без органоспецифічних ознак як фенотип РНПЛ, (n=31)	35,01±6,81	24,92±2,34	0,71±0,82	35,38±17,35
5	Метастаз карцином з клітин Меркеля, (n=6)	35,86±5,93	25,45±2,09	0,80±0,06	78,58±18,13
6	Первинна дрібноклітинна НЕК легень (G3), (n=17)*	21,46±5,15	18,53±2,08	0,72±0,05	49,10±14,60
	$p^{\&}$	p(1) >0,05, p(2) >0,05, p(3) >0,05, p(4) <0,05, p(5) <0,05.	p(1) >0,05, p(2) >0,05, p(3) >0,05, p(4) >0,05, p(5) >0,05.	p(1) >0,05, p(2) >0,05, p(3) >0,05, p(4) >0,05, p(5) >0,05.	p(1) >0,05, p(2) >0,05, p(3) >0,05, p(4) <0,05, p(5) <0,05.

Примітка. n – кількість пухлин, $M \pm SD$ – середнє значення \pm стандартне відхилення, я/к – ядра клітин, & - групи порівняні U-критерієм Манна-Уїтні, ІП – індекс проліферації за Кі-67, НЕП – нейроендокринна пухлина, НЕК – нейроендокринна карцинома, РНПЛ – рак невідомої первинної локалізації, *- порівняння всіх метастатичних НЕК проводилось з первинною дрібноклітинною карциномою легень.

Резюме. Досліджуючи карциноми невідомого первинного джерела з вірогідним легеневим походженням необхідно брати до уваги гістологічні, МФМ, ІГХ характеристики та ІП за Ki-67 через схожість метастазів ПР голови та шиї, гостро-інтестинальних АК та ККМ відповідним варіантам злоякісних пухлин легенів (ПР, АК та НЕК) та недостатню специфічність маркеру TTF-1 (наявність TTF-1 негативних карцином легенів). Використання мінімальних первинної [Pan CK AE1/3 (+), Vimentin (-/+), CD45 (-), S100 і/або НМВ45 (-/+)] і вторинної [СК 7 (+), СК 20 (-), TTF-1 (+)] ІГХ панелей дає можливість знайти необхідні характеристики карцином легенів, а розширення її маркерами СК НМВ, р63, Chromogranin A і / або Synaptophysin і / або CD56 разом з МФМ показниками ядер та ІП за Ki-67 дозволяють визначити варіант карциноми легенів.

Порівняння U-критерієм Манна-Уїтні даних цифрової морфометрії та ІП метастатичних НЕК (G3) без органоспецифічних ознак, як фенотипу РНПЛ, з дрібноклітинними НЕК (G3) легенів виявило достовірну різницю площі ядер клітин ($p < 0,05$) та проліферативної активності за Ki-67 ($p < 0,05$). Натомість метастази НЕК (G3) з імунофенотипом [Pan CK AE1/3 (+), Vimentin (-), Chromogranin A (+/-) і/або Synaptophysin (+/-) і/або CD56 (+), СК 20 (-), СК 7 (+), TTF-1 (+)] й вірогідним походженням з легенів такої різниці не виявили (всі $p > 0,05$). Тому тільки метастатичні НЕК (G3), що мають ІГХ профіль [Pan CK AE1/3 (+), Vimentin (-), Chromogranin A (+/-) і/або Synaptophysin (+/-) і/або CD56 (+) / СК20 (-) / СК7 (+) / TTF-1 (+)] та МФМ показники, що не відрізняються від $21,46 \pm 5,15$ за площею, $8,53 \pm 2,08$ за периметром, $0,72 \pm 0,05$ за коефіцієнтом круглості та високий ІП, доцільно розглядати як метастази дрібноклітинних НЕК (G3) легенів.

5.9 Аденопатія з клітин Меркеля з невідомого джерела

Первинні карциноми з клітин Меркеля ($n_1=9$) були представлені дрібноклітинними «блакитно-клітинними» неоплазіями, що складались з однако-

вих клітин з круглим або овальним ядром і бідною цитоплазмою. Чітка ядерна мембрана відокремлювала дисперсний хроматин та ядерця. На себе звертали увагу чисельні мітотичні фігури та нуклеарні фрагменти (пікноз, рексис), також були представлені окремі диференційовані витягнуті клітини (рис. 5.12).

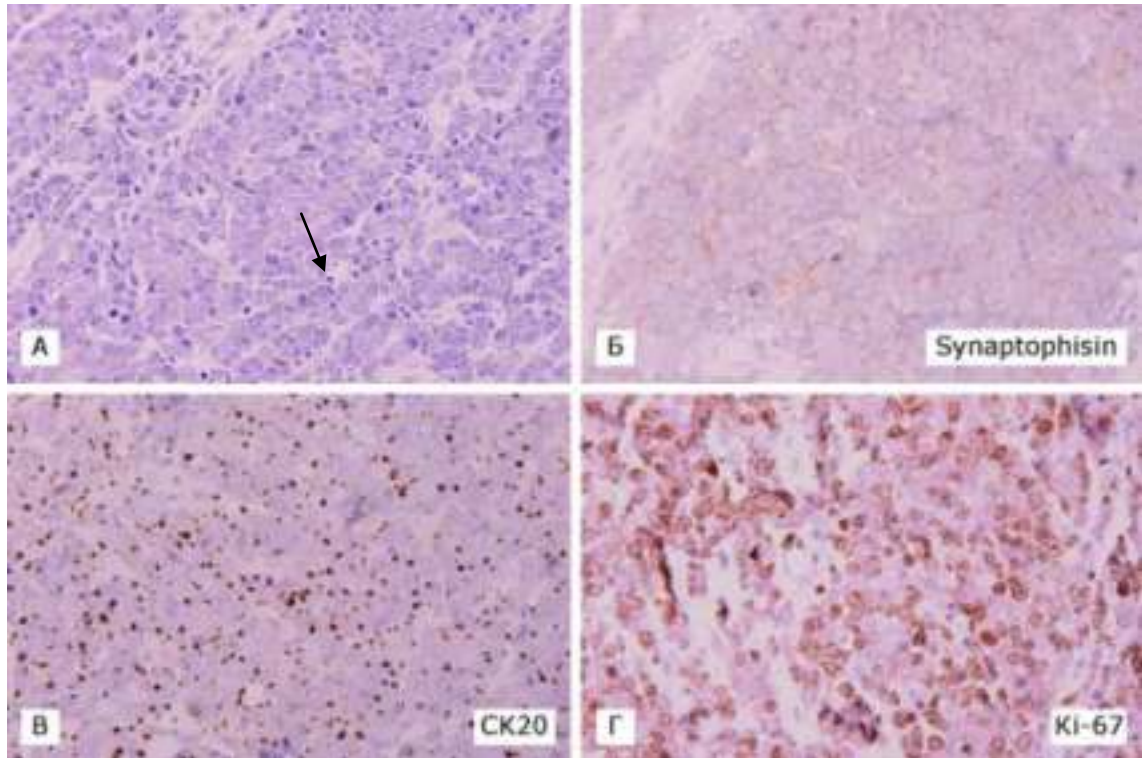


Рисунок 5.12 – Особливості будови клітин первинної карциноми Меркеля: ядра з чіткою ядерною мембраною, що відокремлює дисперсний хроматин та ядерця. Стрілкою позначені нуклеарні фрагменти (пікноз, рексис). А. Забарвлення гематоксилином і еозином. Б. Слабка дифузна експресія Synaptophysin. В. Парануклеарне точкове імуногістохімічне забарвлення СК 20, ІГХ з гематоксилином Майєра. Г. Проліферативна активність за Кі-67 до 68 %, ІГХ з гематоксилином Майєра. Зб.: $\times 400$.

Пухлини були розташовані в центрі дерми і в 4 з 9 випадків (44,44 %) розповсюджувались в підшкірну клітковину. Тільки в 1 з випадків був залучений епідерміс (педжетоїдний вигляд ураження), але в інших спостереженнях виникало виразкування епідермісу.

В більшості спостережень неоплазми формували дифузні сітки та солідні гнізда в дермі. На периферії мали місце трабекулярні патерни, у вигляді «сіток» та «гірлянд», в 2 з 9 (22,22 %) формувались псевдорозетки. Дерма навколо пухлин в 6 з 9 (66,67 %) демонструвала десмопластичну реакцію та зональні пухлинні некрози з ангіолімфотичним залученням.

За гістологічними формами первинні ККМ поділились на три групи: трабекулярні ККМ - 4 з 9 (44,44 %), перехідні – 3 з 9 (33,33 %), дрібноклітинні – 2 з 9 (22,22 %). Показники морфометричного дослідження були занесені в таблицю 5.17.

Таблиця 5.17 – Показники морфометричного дослідження ядер клітин спостережень метастазів та первинних карцином з клітин Меркеля в програмі ImageJ, $M \pm SD$, μm^2 , μm , %

Тип карциноми	Площа я/к (μm^2)	Периметр я/к (μm)	Коефіцієнт круглості я/к
Первинна карцинома з клітин Меркеля, (n=9)	37,26 \pm 5,69	25,06 \pm 1,52	0,79 \pm 0,04
Метастаз карцином з клітин Меркеля, (n=6)	35,86 \pm 5,93	25,45 \pm 2,09	0,80 \pm 0,06
p	p ^{&} >0,05	p ^{&} >0,05	p ^{&} >0,05

Примітка. n – кількість пухлин, $M \pm SD$ – середнє значення \pm стандартне відхилення, я/к – ядра клітин, & - групи порівняні U-критерієм Манна-Уїтні.

Всі карциноми з клітин Меркеля продемонстрували епітеліальну та нейроендокринну диференціацію. Специфічним виявилось парануклеарне точкове імуногістохімічне забарвлення СК20 цитокератинів, яке в половині спостережень мало навколядерне «dot-like» забарвлення. Позитивна реакція виявлялась також на маркери Synaptophysin та Chromogranin A, CD117. І була цілком негативна на пан-лейкоцитарний антиген CD45, Vimentin, S100.

Всі метастатичні ураження (n₂=6) були проаналізовані за патернами гістологічної будови і відповідали «епітеліоїдній» морфології та фенотипу [Pan

СК AE1/3 (парануклеарне +), СК 20 (парануклеарне +), Vimentin (-), CD45 (-), S100 і/або НМВ45 (-)] після ІГХ дослідження (рис. 5.13).

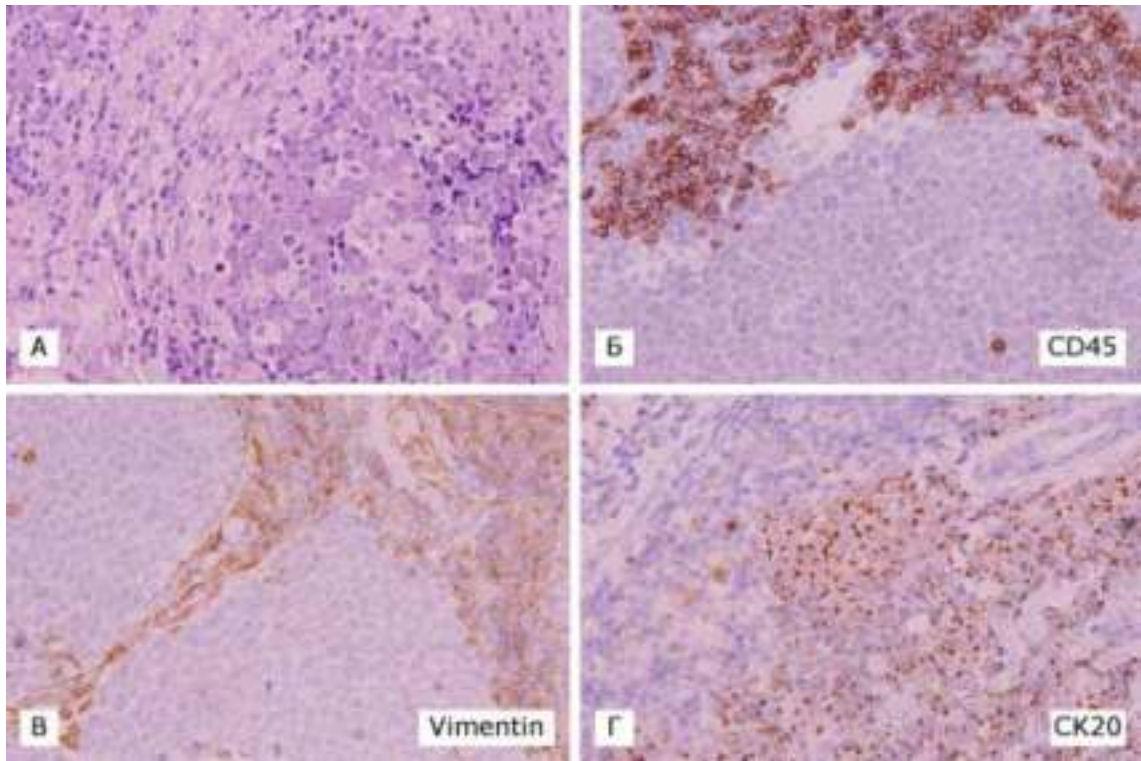


Рисунок 5.13 – Метастатичне ураження лімфатичного вузла карциномою з клітин Меркеля. А. Лімфоцити навколо метастазу трохи менші ніж клітини карциноми і відокремлені ретикулярною стромою, забарвлення гематоксиліном і еозином. Б. Позитивна мембранна експресія лімфоцитами CD45 і негативна в клітинах карциноми, ІГХ з гематоксиліном Майєра. В. негативна реакція Vimentin в пухлинних клітинах і позитивна в лімфоїдних клітинах оточення, ІГХ з гематоксиліном Майєра. Г. Навколоядерне «dot-like» забарвлення СК 20 в клітинах метастазу, ІГХ, додаткове забарвлення гематоксиліном Майєра. Зб.: $\times 400$.

Морфологічні типи метастатичних карцином з клітин Меркеля включали 2 перехідні форми та 4 дрібноклітинні карциноми, що значно рідше демонстрували трабекулярні патерни чи псевдорозетки, натомість мали солідні поля мноморфних клітин із внутрішньо судинною інвазією та стромальною реакцією. Різниця в розподілі гістологічних форм первинних та метастатичних ККМ знайшла своє відображення в зменшенні розмірів клітин метастати-

чних ККМ, але статистично достовірної різниці між групами дослідження виявити за показниками їх морфометричного дослідження програмою ImageJ виявлено не було (всі $p > 0,05$) (табл. 5.17).

Таблиця 5.18 – Показники морфометричного дослідження спостережень метастазів та первинних карцином з клітин Меркеля в програмі ImageJ, n, $M \pm SD$, $\mu\text{м}^2$, $\mu\text{м}$, %

Група дослідження	Площа ядер клітин ($\mu\text{м}^2$)	Периметр ядер клітин ($\mu\text{м}$)	Коефіцієнт круглості ядер клітин
Первинні ККМ (1), (n=9)	37,26 \pm 5,69	25,07 \pm 1,52	0,79 \pm 0,04
Метастази ККМ (2), (n=6)	35,86 \pm 5,93	25,45 \pm 2,09	0,80 \pm 0,06
Еталон МФМ (звичайні лімфоцити)*	16,74 \pm 2,69	15,99 \pm 1,54	0,75 \pm 0,09
p	$p^*(1) \& < 0,05$, $p^*(2) \& < 0,05$	$p^*(1) \& < 0,05$, $p^*(2) \& < 0,05$	$p^*(1) \& > 0,05$, $p^*(2) \& > 0,05$

Примітка. n - кількість пухлин, $M \pm SD$ – середнє значення \pm стандартне відхилення, & - групи порівняні U-критерієм Манна-Уїтні, * - порівняння всіх 1 і 2 груп карцином проводили з розмірами звичайних лімфоцитів лімфатичного вузла.

З метою диференціальної діагностики ККМ з іншими карциномами, морфометричні показники первинних та метастатичних карцином з клітин Меркеля були порівняні із Vimentin-позитивними лімфоїдними клітинами оточення (табл. 5.18). Виявлено двократну різницю за площею ($p(1) < 0,05$, $p(2) < 0,05$) та периметром ($p(1) < 0,05$, $p(2) < 0,05$) пухлинних клітин ККР обох груп та звичайних лімфоцитів.

Резюме. Карциноми без первинної локалізації можуть бути трактовані як метастаз карциноми з клітин Меркеля, якщо вони демонструють фенотип [Pan CK AE1/3 (парануклеарно +), CK20 (парануклеарно +), Vimentin (-), CD45 (-), S100 i/або HMB45 (-), Chromogranin A (+), Synaptophysin (+)], а також мають ядра, площа й периметр яких перевищують в середньому в 2 рази відповідні показники звичайних лімфоцитів, (всі $p > 0,05$) та відносяться до категорії дрібно-кругло-синьо-клітинних пухлин.

Метастатичні карциноми з клітин Меркеля, порівняно із первинними, частіше демонструють низькодиференційовані дрібноклітинні та перехідні форми, що вимагають додаткового проведення імуногістохімічного дослідження з метою виключення метастазів карцином іншого походження.

Основні положення цього розділу опубліковані в 10-ти статтях [212-221], 2 тезах [222-223], 1 патенті України на корисну модель № 111478 [224] та 1 інформаційному листі № 68-2019 про нововведення в системі охорони здоров'я [225].

РОЗДІЛ 6

ОСОБЛИВОСТІ ЕКСПРЕСІЇ ІМУНОГІСТОХІМІЧНИХ МАРКЕРІВ P16 Й HER-2/NEU ТА ЗМІНИ ВІДПОВІДНИХ ГЕНІВ В СПРИЯТЛИВИХ ФЕНОТИПАХ КЛІНІКО-МОРФОЛОГІЧНОГО СИНДРОМУ «РАКИ НЕВІДОМОЇ ПЕРВИННОЇ ЛОКАЛІЗАЦІЇ»

Застосування молекулярного профілювання та секвенування генів з метою розширення обсягу терапевтичних цілей набуває все більшого клінічного значення в онкології. Як приклад можна навести карциноми МЗ, КРК, недрібноклітинний рак легенів, при яких застосування таргетної терапії на сучасному етапі значно покращує показники виживаємості. Але клінічні дослідження для пацієнтів із клініко-морфологічним синдромом «РНПЛ» часто неможливі через низку проблем: відсутності верифікованого первинного джерела, неоднорідності клінічних груп за локалізацією непластичних процесів та імунофенотипами пухлин тощо.

61 випадок з сприятливих фенотипів РНПЛ розподілявся на:

3 (4,9 %) екстрагонадні герміногенні непластичні процеси (2 герміноми / семіноми середостіння з профілем [PLAP (+), CD117 (+), α FP (-), CD30 (-)] та 1 ембріональна карцинома за очеревинного простору [PLAP (+,-), CD117 (-), Pan CK AE1/3 (+), EMA (+), CD30 (+)];

6 (9,8 %) папілярних канцероматозів черевної порожнини вірогідно з яєчника (5 серозних АК [CA-125 (+), CK 7 (+), CK 20 (-), WT-1 (+), ER (+), PAX-8 (+)] та 1 муцинозна АК [CA-125 (+), CK 7 (+), CK 20 (+), WT-1 (-), ER (+), PAX-8 (-)];

5 (8,2 %) метастазів аксиллярних лімфатичних вузлів жінок (3 люмінального типу А з [CK 7 (+), ER (+), PGR (+), HER-2/neu (++)/+++]) та 2 люмінального типу В з [CK 7 (+), ER (+), PGR (+), HER-2/neu (+/-)];

12 (19,7 %) метастазів плоскоклітинних раків (ПР) в лімфатичні вузли ший з вірогідним походженням з голови та ший [Pan CK AE1/3 (+), Vimentin (-), CK HMW (+), p63 (+), CK 7 (-), CK 20 (-), TTF-1 (-)];

9 (14,7 %) пахових метастазів ПР [Pan CK AE1/3 (+), Vimentin (-), CK HMW (+), p63 (+), CK 7 (-), CK 20 (-)];

10 (16,4 %) низькодиференційованих нейроендокринних карцином без органоспецифічних ознак [Pan CK AE1/3 (+), Chromogranin A (+/-) і/або Synaptophysin (+/-) і/або CD56 (+/-)], всі зазначені випадки були знайдені в печінці);

4 (6,5 %) метастази кісток у чоловіків з підвищеним сироватковим маркером PSA [CK 8 (+), PSA (+), AMACR (p504s) (+), AR (+/-)];

9 (14,7 %) метастазів з колоректальним фенотипом [CK 7 (-), CK 20 (+), CDX-2 (+)];

та 3 (4,9 %) метастаза карцином з клітин Меркеля [Pan CK AE1/3 (парануклеарно +), CK 20 (парануклеарно +), Vimentin (-), Chromogranin A (+), Synaptophysin (+)].

Низькодиференційована карцинома з розподілом по середній лінії тіла (екстрагонадний зародково-клітинний синдром) (n=3, 4,9 %).

Екстрагонадний зародково-клітинний синдром (позагонадна неоплазія статевих клітин), характеризується триплоїдизацією та асоціюється з характерною серією аномалій шляху ретинобластоми, включаючи регуляцію цикліну D, p27 та зниження активності інгібіторів циклін-залежних кіназ p16, p18, p19 та p21 [226].

Деякі з них, а саме CDKN2A, CDKN2C та CDKN2D, часто зовсім інактивуються [227]. В нашому дослідженні при проведенні ІГХ з маркером p16^{INK4A} в 2 зразках позаганадних семіном та 1 ембріональній карциномі була отримана негативна експресія цього маркеру. FISH дослідження продемонструвало відсутність делецій 9p21 (рис. 6.1).

HER-2 / neu є an рецептор епідермального фактора росту, який надмірно виражений на поверхня клітин приблизно 25-30 % раку молочної залози. Потенційна роль HER-2/neu в пухлинах зародкових клітин вивчена недостатньо. Підвищена експресія HER-2/neu найчастіше результат ампліфікації он-

когену HER-2/neu; надмірна експресія білка за відсутності ампліфікації генів рідкісна. Таким чином, HER-2/neu виявляється корисною терапевтичною мішенню. За рекомендаціями Soule S. із співавт. (2002) мембранне ІГХ фарбування ми оцінювали за шкалою підрахунку HER-2/neu, від 0 до 3+, розробленою для молочної залози [228]. Підвищеною експресією вважали 2+ або 3+ результат. Тільки в одному випадку первинної семіноми середостіння ІГХ продемонструвало HER-2/neu (3+) статус та FISH дослідження підтвердило наявність ампліфікації гену ERBB2 (рис. 6.1).

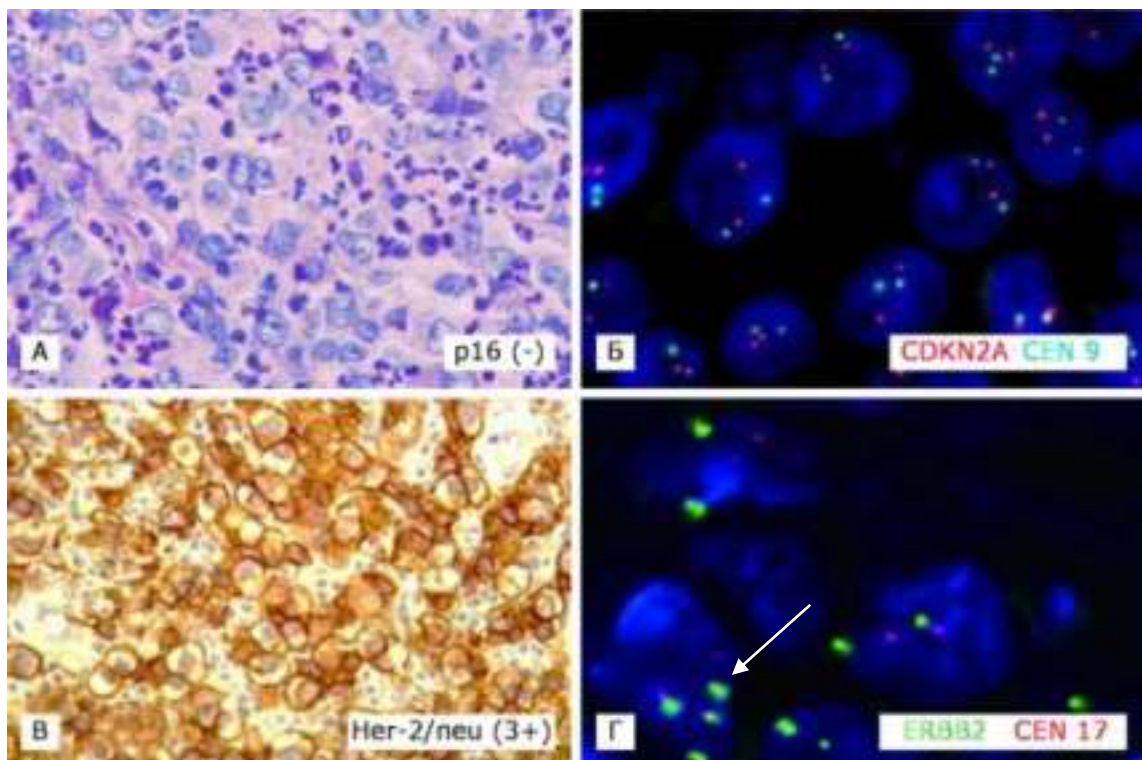


Рисунок 6.1 – Семінома середостіння. А. Негативна експресія p16^{INK4A}, ІГХ з гематоксиліном Майєра. Зб.: ×600. Б. Відсутність делеції 9p21 – наявність по два сигнали зеленого та жовтогарячого кольору в кожній клітині, FISH, сигнали зонда CDKN2A проілюстровані жовтогарячим кольором, сигнали зонда центромери 9 (CEN9) показані зеленим кольором. В. Позитивна мембранна експресія HER-2/neu (3+), ІГХ з гематоксиліном Майєра. Зб.: ×600. Г. Ампліфікація HER2, FISH, сигнали зонда EGBB2 проілюстровані зеленим кольором (стрілка), тоді як сигнали зонда центромери 17 (CEN17) показані жовтогарячим кольором.

Жінки з папілярною аденокарциномою черевної порожнини (6, 9,8 %).
Оцінюючи типи папілярного канцероматозу за фенотипом і ІГХ реакцією на

p16^{INK4A}, в дослідженні виявилось що серозні WT-1 (+) карциноми мали значно більш інтенсивне забарвлення та кількість p16^{INK4A} (+) клітин, порівняно із муцинозним варіантом, що був негативним на p16^{INK4A}. 4 з 5 (80 %) «high-grade» серозних АК мали градацію в діапазоні 6+ – 12+ (рис. 6.2). Критерії ІГХ оцінювались за рекомендаціями Phillips V. та співавт. (2009): по розподілу імунореактивності (0-5) і по інтенсивності (0-3), таким чином був розрахований імуногістохімічний бал (0-15) шляхом множення балів розподілу та інтенсивності [229].

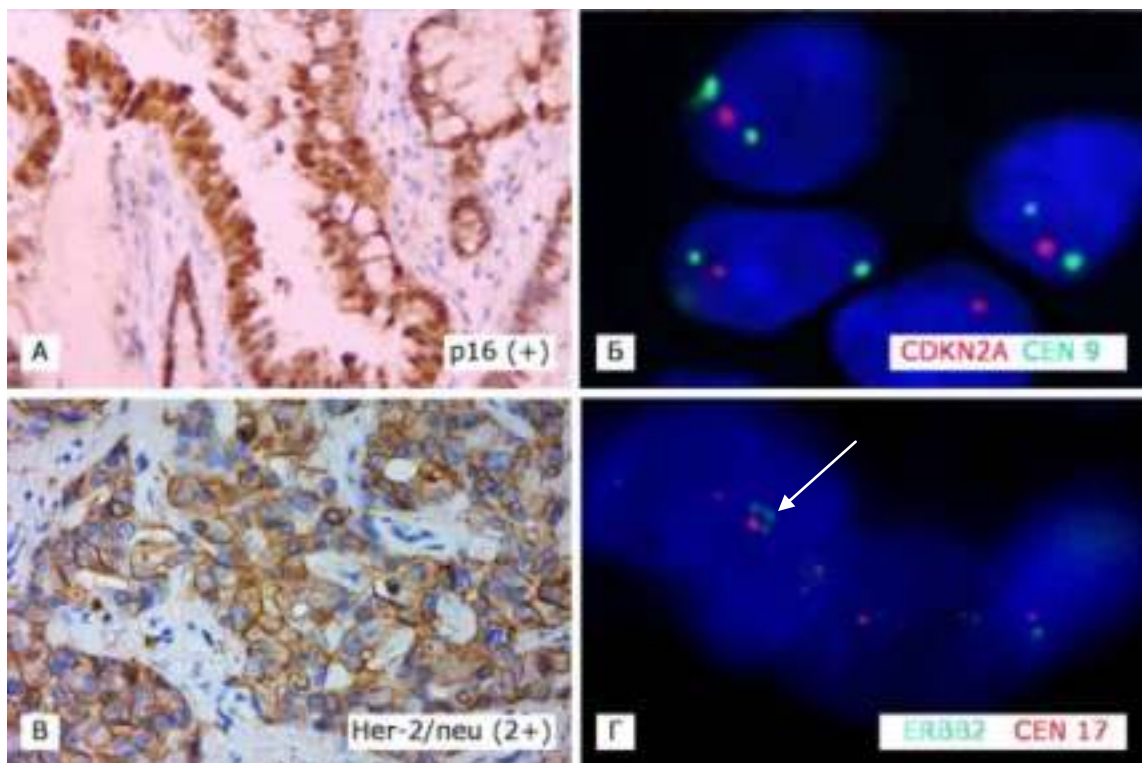


Рисунок 6.2 – Серозний «high-grade» папілярний канцероматоз. А. Позитивна ядерно-цитоплазматична експресія p16^{INK4A}, ІГХ з гематоксиліном Майєра. Зб.: ×400. Б. Гетерозиготна делеції 9p21 – втрата одного сигналу жовтогарячого кольору, FISH, сигнали зонда CDKN2A жовтогарячого кольору, сигнали зонда центромери 9 (CEN9) зеленого кольору. В. Позитивна мембранна експресія HER-2/neu (2+), ІГХ з гематоксиліном Майєра. Зб.: ×600. Г. Ампліфікація HER2, FISH, сигнали зонда EGBB2 зеленого кольору (стрілка), сигнали зонда центромери 17 (CEN17) жовтогарячого кольору.

Але FISH аналіз виявив тільки гетерозиготні делеції 9p21 у 3 з 6 досліджених канцероматозів (50 %), всі вони були представлені серозними «high-grade» фенотипами (рис. 6.2). Роботи з подібними даними рекомендують ви-

користувати цей факт для метастатичних процесів черевної порожнини з яєчників в якості диференційної діагностики із злоякісною мезотеліомою, де гомозиготна делеція 9p21 зустрічається набагато частіше.

Спостережувані показники надмірної експресії / посилення HER2 в карциномах яєчників показують значну різницю між дослідженнями, коливаючись від 8 % до 66 %, але ефективність лікування таргетним до HER2 препаратом в поєднанні з хіміотерапією не перевірена. Аналіз ПХ дослідження проводили за стандартною схемою, отримали 2 з 6 (33 %) позитивних HER2 2+ або 3+ спостереження, де FISH також визначило ампліфікацію гена ERBB2 (рис. 6.2).

Жінки з аденокарциномою, що уражує тільки аксиллярні лімфатичні вузли (n=5, 8,2 %). За результатом внутрішнього контролю та літературними даними базовий рівень ПХ експресії p16^{INK4A} в нормальних тканинах молочної залози негативний або низької інтенсивності і охоплює <5 % клітин. В нашому дослідженні клітини 2 метастатичних карцином (40 %) мали експресію p16^{INK4A} на помірному рівні (+2), і в 1 спостереженні (20 %) на достатньо слабкому (+1) (рис. 6.3).

Критерії ПХ оцінювались за рекомендаціями Leboк P. та співавт. (2016): (0) - відсутність фарбування; (1+) слабе фарбування у ≤ 70 % клітин або помірне фарбування у ≤ 30 %; (2+) помірне фарбування у > 70 % клітин або інтенсивне забарвлення в > 30 %; (3+) інтенсивне забарвлення в > 70 % клітин, що було розроблено саме для цієї локалізації [12].

Репрезентативні поля зору досліджені з FISH: гомозиготна делеція 9p21 в 1 спостереженні (20 %) й гетерозиготна в 2 метастазах (40 %), до того ж, зазначені спостереження показали (2+ / 3+) за HER-2/neu статусом. FISH продемонстрував в 2 випадках наявність ампліфікацію гена ERBB2 (рис. 6.3).

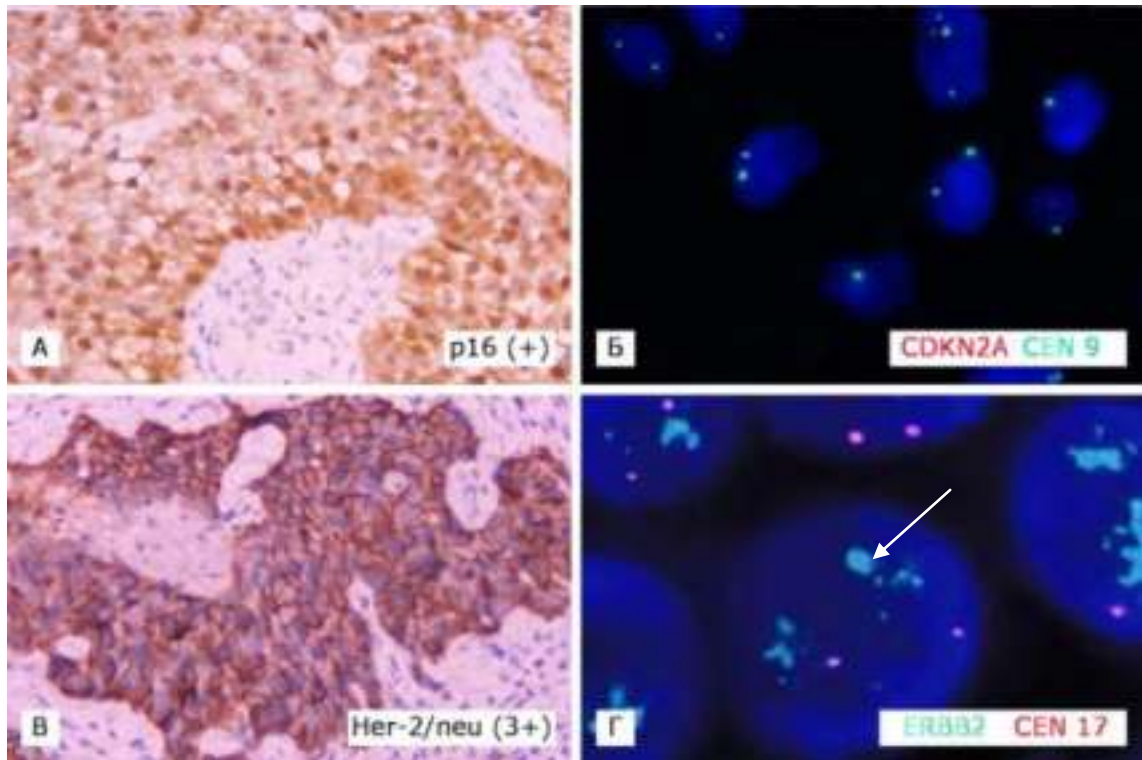


Рисунок 6.3 – Метастаз протокової карциноми молочної залози люмінального типу А в аксиллярний лімфатичний вузол. А. Позитивна ядерно-цитоплазматична експресія $p16^{\text{INK4A}}$, ІГХ з гематоксиліном Майєра. Зб.: $\times 400$. Б. Гомозиготна делеція 9p21 – втрата обох сигналів жовтогарячого кольору, FISH, зонда CDKN2A жовтогарячого кольору, сигнали зонда центромери 9 (CEN9) зеленого кольору. В. Позитивна мембранна експресія HER-2/neu (3+), ІГХ з гематоксиліном Майєра. Зб.: $\times 400$. Г. Ампліфікація HER2 (велика кількість копій EGBB2), FISH, сигнали зонда EGBB2 зеленого кольору (стрілка), сигнали зонда центромери 17 (CEN17) жовтогарячого кольору.

Плоскоклітинна карцинома, що вражає шийні лімфатичні вузли (n=12, 19,7 %). Повідомлення про порушення CDKN2A (p16) є частим явищем в плоскоклітинних карциномах голови та шиї, що онкологи пов'язують з несприятливим прогнозом. ІГХ аналіз метастатичних плоскоклітинних карцином за експресією $p16^{\text{INK4A}}$ продемонстрував значні відмінності в гендерному співвідношенні: 4 з 5 (80 %) метастазів у жінок мали + або +/- за експресією $p16^{\text{INK4A}}$, на відміну від них 7 чоловічих випадків, які поділились 2:5 ($p16^{\text{INK4A}+}$ (29,0 %) до $p16^{\text{INK4A}-}$ (71,0 %)), що в літературних джерелах пов'язують з особливостями канцерогенного впливу вірусу папіломи людини високого онкогенного ризику (здебільшого типи 16 і 18). Позитивність на

p16^{INK4A}+ (або надекспресія) нами визначалась як помірне або сильне забарвлення у > 70 % пухлинних клітин, за рекомендаціями Lim A. M. та співавт. (2016) [230]. FISH дослідження виявило гомозиготну делецію 9p21 у 4 метастазах (33,0 %) (1 чоловік і 3 жінки) і гетерозиготну делецію у 2 спостереженнях (17,0 %) (1 чоловік і 1 жінка) (рис. 6.4).

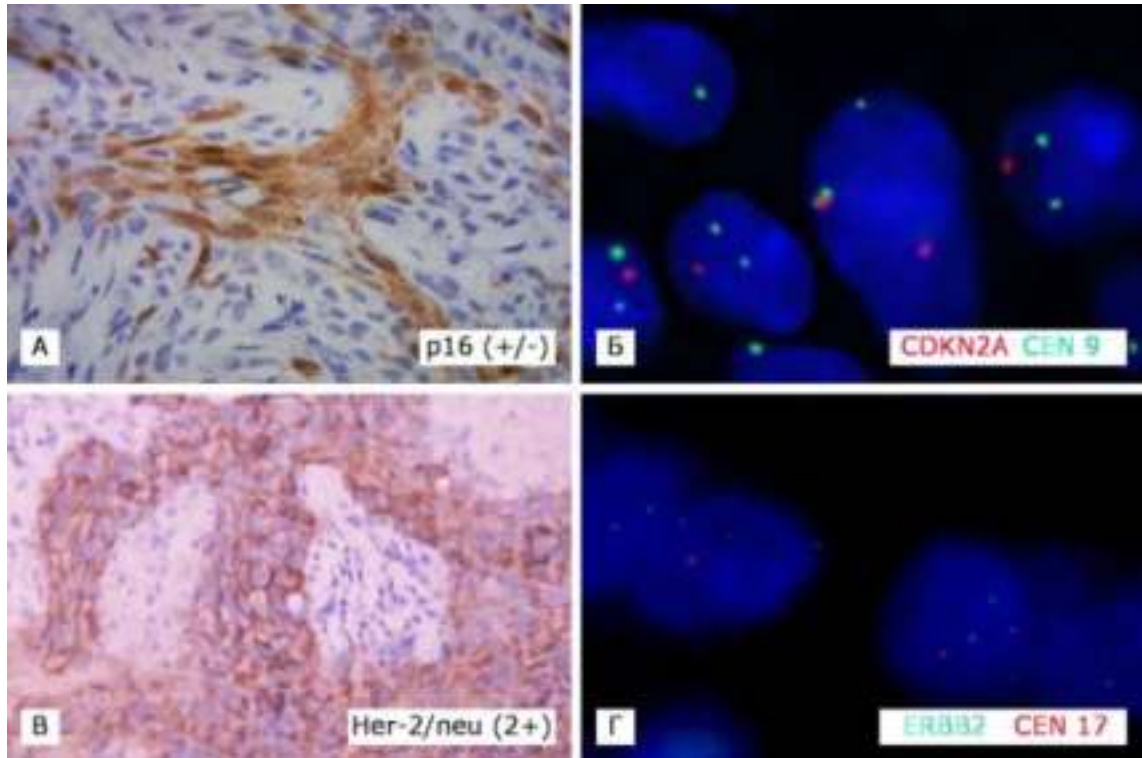


Рисунок 6.4 – Метастаз плоскоклітинного раку в лімфатичні вузли ший. А. Ядерно-цитоплазматична експресія p16^{INK4A} групи клітин, ІГХ з гематоксиліном Майєра. Зб.: ×400. Б. Гетерозиготна делеції 9p21 – втрата одного сигналу жовтогарячого кольору, FISH, зонд CDKN2A жовтогарячого кольору, зонд CEN9 зеленого кольору. В. Позитивна мембранна експресія HER-2/neu (2+), ІГХ з гематоксиліном Майєра. Зб.: ×200. Г. Відсутність ампліфікації EGVB2, FISH, зонд EGVB2 зеленого кольору, зонд CEN17 жовтогарячого кольору.

Зустрічаємість ампліфікації ERBB2 описана в плоскоклітинних раках голови та ший як нехарактерні спорадичні мутації, але які призводять до агресивної поведінки з наступним метастазуванням в лімфатичні вузли ший. В нашому дослідженні маркер HER-2/neu в 1 зразку мав рівень експресії 2+, що на FISH дослідженні спростувало наявність ампліфікації ERBB2 (рис. 6.4).

Ізольована пахова аденопатія (плоскоклітинна карцинома) (n=9, 14,7 %). Ушкодження пахових лімфатичних вузлів плоскоклітинною карциномою вірогідно пов'язано із дисемінацією ПР статевих органів, чий канцерогенез подібно ПР орофарінгеальної області пов'язаний з ВПЛ. 5 з 9 (55 %) пахових аденопатій з метастазами ПР визначились у жінок і мали на ІГХ p16^{INK4A} (+) статус, на відміну від чоловіків з p16^{INK4A} (-) статусом пухлин. Відповідно FISH тільки у жінок підтвердило наявність гомозиготної делеції 9p21 у 2 метастазах ПР (22,0 %) і гетерозиготних також у 2 спостереженнях (22,0 %) ПР (рис. 6.5).

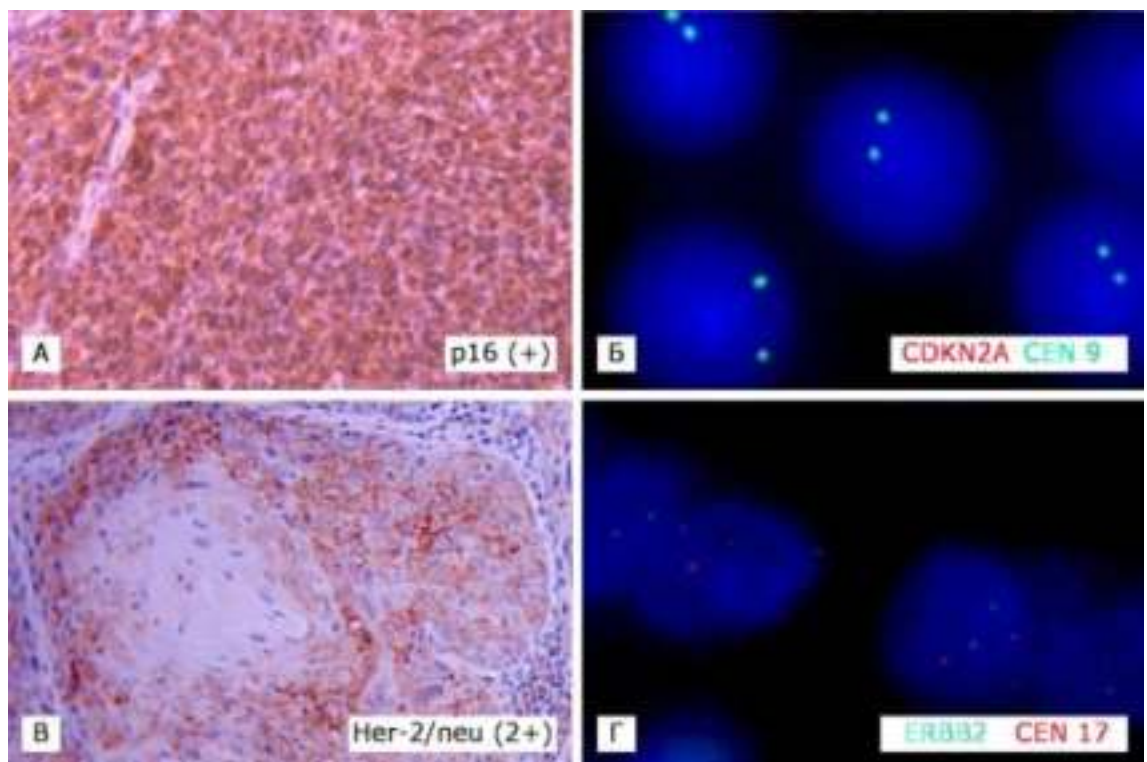


Рисунок 6.5 – Метастаз плоскоклітинного раку в паховий лімфатичний вузол. А. Позитивна експресія p16^{INK4A}, ІГХ з гематоксиліном Майєра. Зб.: ×400. Б. Гомозиготна делеції 9p21 – втрата обох сигналів жовтогарячого кольору, FISH, зонд CDKN2A жовтогарячого кольору, зонд CEN9 зеленого кольору. В. Позитивна мембранна експресія HER-2/neu (2+), ІГХ з гематоксиліном Майєра. Зб.: ×200. Г. Відсутність ампліфікації HER2, FISH, зонд ERBB2 зеленого кольору, зонд CEN17 жовтогарячого кольору.

Аналіз ІГХ реакцій з маркером HER-2/neu лише в 2 спостереженнях показав рівень до 2+, але після FISH дослідження вони не підтвердили ампліфікацію гена ERBB2 (рис. 6.5).

Низькодиференційована нейроендокринна карцинома (n=10, 16,4 %).
 Всі спостереження НЕК (G3) характеризувались високим ІП та низьким ступенем диференціювання, представляли собою метастази печінки без первинного джерела. Експресія маркеру p16^{INK4A} продемонструвала +/- (невелика кількість клітин із змішаною реакцією) в 2 спостереженнях у жінок (20,0 %), які також мали слабку експресію естрогенових рецепторів та СК 7, що робить вірогідним походження з МЗ. Саме в цих випадках FISH дослідження виявило гетерозиготну делецію 9p21 (20 %) (рис. 6.6).

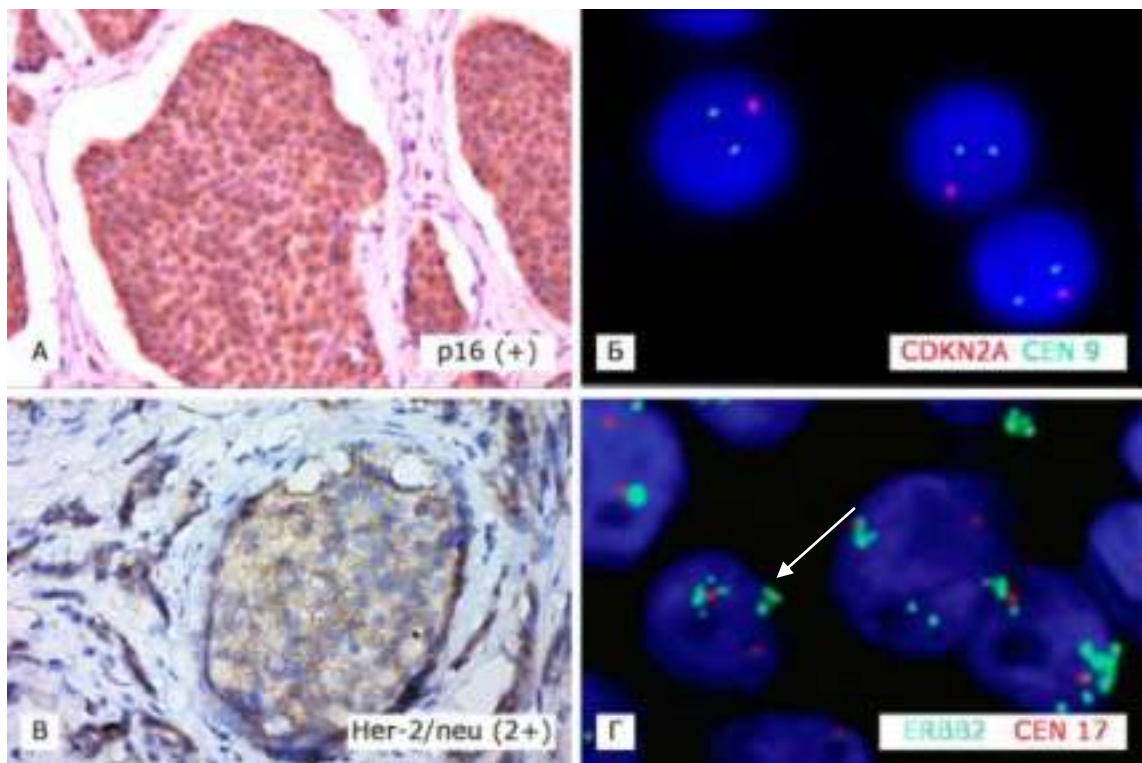


Рисунок 6.6 – Метастаз нейроендокринної карциноми в печінку. А. Позитивна експресія p16^{INK4A}, ІГХ з гематоксиліном Майєра. Зб.: ×400. Б. Гетерозиготна делеція 9p21, FISH, зонд CDKN2A жовтогарячого кольору, зонд CEN9 зеленого кольору. В. Позитивна мембранна експресія HER-2/neu (2+), ІГХ з гематоксиліном Майєра. Зб.: ×400. Г. Ампліфікація HER2 (стрілка), FISH, зонд EGBB2 зеленого кольору, зонд CEN17 жовтогарячого кольору.

Аналіз ІГХ реакцій з маркером HER-2/neu в 2 (20 %) спостереженнях показав рівень до 2+/3+, що в 1 випадку показало ампліфікацію гена ERBB2 на FISH (рис. 6.6).

Чоловіки з бластними метастазами кісток і підвищенням сироваткового PSA (аденокарциноми) ($n=4$, 6,5 %). Проаналізувавши спостереження метастатичних АК кісток в межах фенотипу синдрому «РНПЛ», виявилось що в 2 з них (50,0 %) маркер $p16^{INK4A}$ дав змішану експресію в частині клітин, що оцінювалось за рекомендаціями фахівців Remo A. і співавт. (2016) [231]. Цікавим виявилось, що сила забарвлення на $p16^{INK4A}$ була інколи вище інтенсивності експресії діагностичних маркерів AMACR (p504s) та PSA. Але FISH аналіз виявив тільки гетерозиготну делецію 9p21 в 1 з 4 випадків (25,0 %) (рис. 6.7).

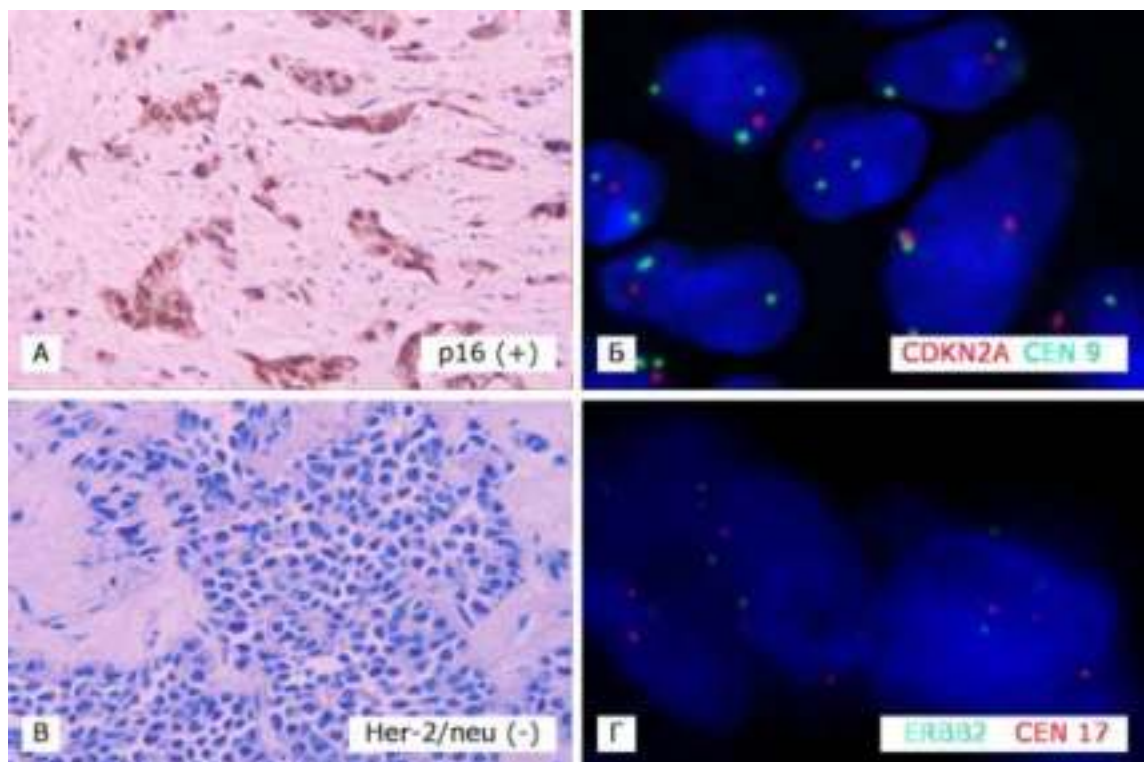


Рисунок 6.7 – Метастаз аденокарциноми в кістки у чоловіків з високим рівнем PSA. А. Позитивна експресія $p16^{INK4A}$, ІГХ з гематоксиліном Майєра. Зб.: $\times 400$. Б. Гетерозиготна делеції 9p21, FISH, зонд CDKN2A жовтогарячого кольору, зонд CEN9 зеленого кольору. В. Негативна експресія HER-2/neu, ІГХ з гематоксиліном Майєра. Зб.: $\times 400$. Г. Відсутність ампліфікації HER2, FISH, зонд EGBB2 зеленого кольору, зонд CEN17 жовтогарячого кольору.

Всі спостереження метастазів кісток у чоловіків за HER-2/neu ІГХ статусом та FISH показали негативну відповідь (рис. 6.7).

Аденокарциноми коло ректального профілю [CK20 (+) / CK7 (-) / CDX-2 (+)] ($n=9$, 14,7 %). Позитивний статус p16^{INK4A} (+) виявився в більшості метастазів КРР з різною інтенсивністю забарвлення 2 (1+) і 5 (2+), оціненою за шкалою від 0 до 3 балів, розробленою Al-Ahwal M. із співавт. (2016): (3+) - ІГХ реакція > 40 % клітин, (2+) 10–40 % клітин, (1+) в <10 % [232]. Дослідження колоректальних карцином FISH виявило гомозиготну делецію 9p21 у 2 метастазах печінки (22 %) та гетерозиготну у 4 інших спостереженнях (2 яєчника та 2 канцероматозу очеревини) (44 %) (рис. 6.8).

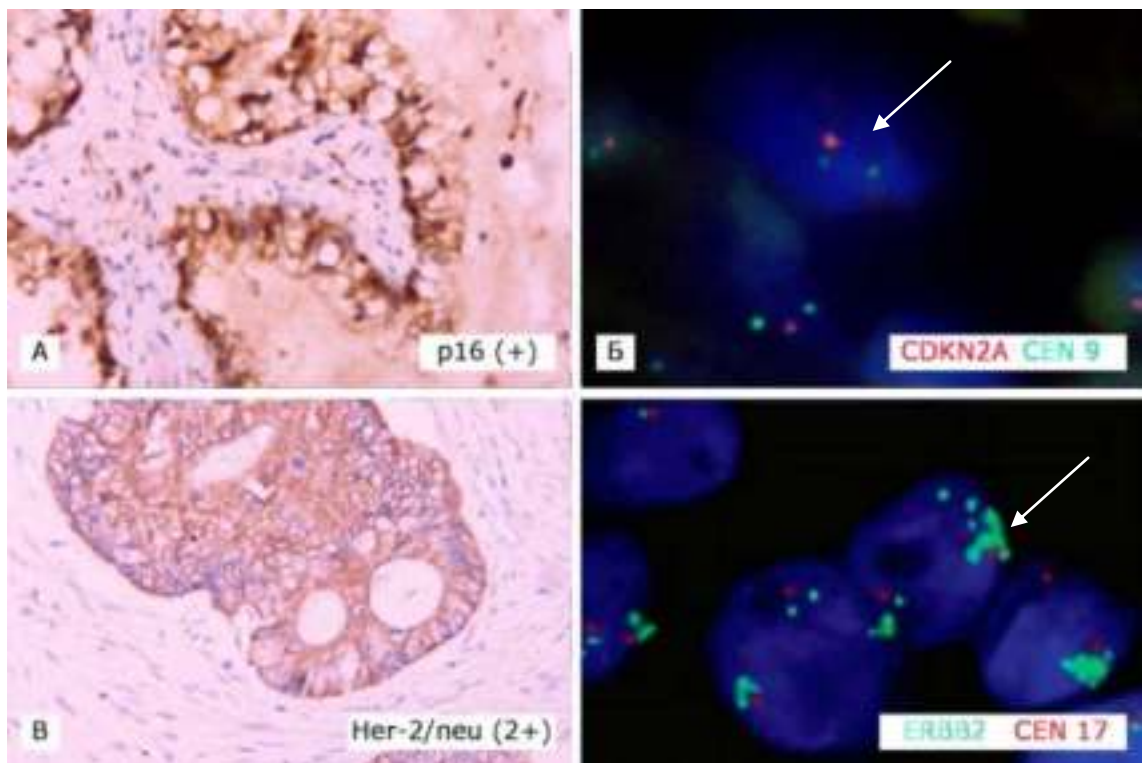


Рисунок 6.8 – Метастаз колоректального раку в печінку. А. Позитивна експресія p16^{INK4A}, ІГХ з гематоксиліном Майєра. Зб.: $\times 400$. Б. Гетерозиготна делеції 9p21 (стрілка), FISH, зонд CDKN2A жовтогарячого кольору, зонд CEN9 зеленого кольору. В. Позитивна мембранна експресія HER-2/neu (2+), ІГХ з гематоксиліном Майєра. Зб.: $\times 400$. Г. Ампліфікація HER2 (стрілка), FISH, зонд EGBB2 зеленого кольору, зонд CEN17 жовтогарячого кольору.

Зареєстровані показники надмірної експресії білка HER-2/neu навіть в первинних колоректальних карциномах коливалися в межах від 3 % до 47,4 %, що свідчить про те, що клінічна значимість HER-2/neu для метастатичних форм тим більше повністю не з'ясована. ІГХ дослідження з епідермальним

фактором росту HER-2/neu в 4 метастазах (44 %) показав рівень до 2+/3+. Але тільки 2 з них мали дійсну ампліфікацію гена ERBB2 на FISH (рис. 6.8).

Аденопатія з клітин Меркеля невідомого походження (n=3, 4,9 %). Поліомавірус карциноми з клітини Меркель (MCMV), нещодавно виявлений онкогенний вірус людини, зустрічається в більшості карцином з клітин Меркеля. Великий Т-антиген цього вірусу зв'язується з Rb, і функціонально аналогічний білку E7 вірусу папіломи людини (HPV) високого онкогенного ризику. Добре зафіксовано, що інактивація Rb призводить до надекспресії p16^{INK4A} (рис. 6.9).

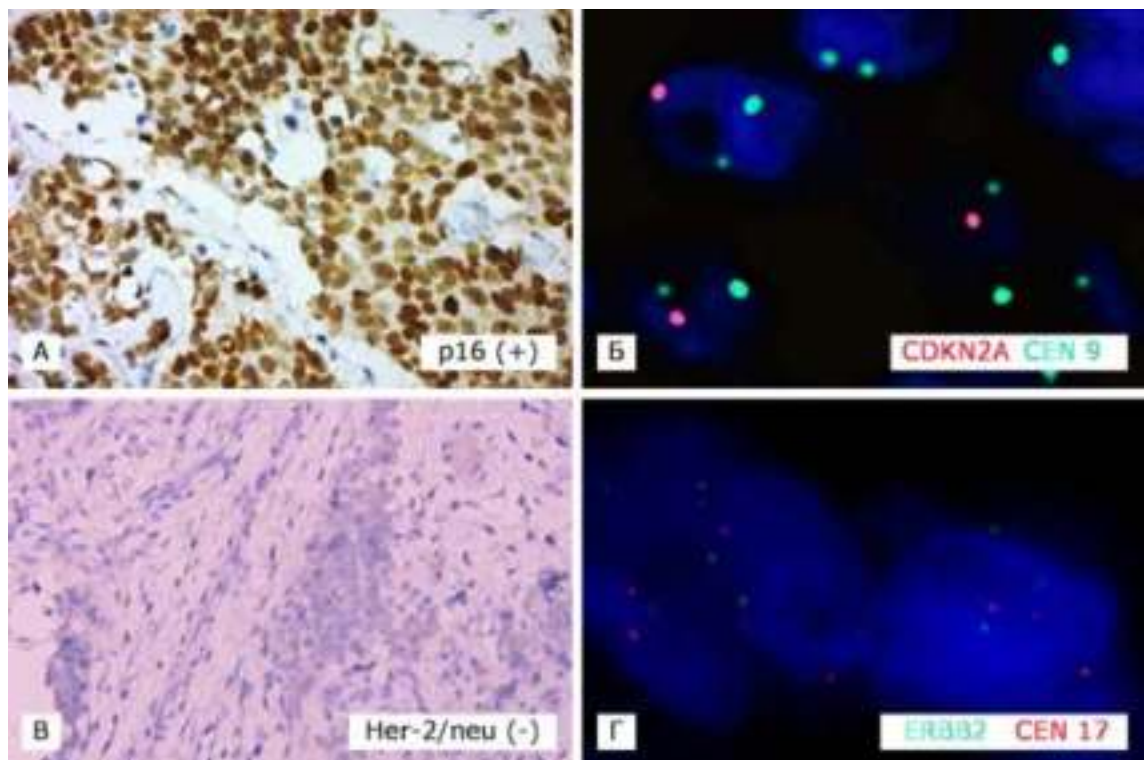


Рисунок 6.9 – Метастаз карциноми з клітин Меркеля. А. Позитивна експресія p16^{INK4A}, ІГХ з гематоксиліном Майєра. Зб.: ×400. Б. Гетерозиготна делеції 9p21, FISH, зонд CDKN2A жовтогарячого кольору, зонд центромери 9 (CEN9) зеленого кольору. В. Негативна експресія HER-2/neu (-), ІГХ з гематоксиліном Майєра. Зб.: ×400. Г. Відсутність ампліфікації гена EGBB2, FISH, зонд EGBB2 зеленого кольору, зонд CEN17 жовтогарячого кольору.

ІГХ реакції з p16^{INK4A} виявились строго позитивними (ядерно-цитоплазматичне забарвлення) в 2 зразках карцином з клітин Меркеля. Це

свідчить про спорідненість онкогенних шляхів MCV та HPV. Крім того, позитивність p16^{INK4A} може бути корисним діагностичним інструментом при диференціації карциноми з клітин Меркеля від інших дрібно-кругло-синьо-клітинних анапластичних пухлин, до групи яких вони відносяться. FISH продемонструвало наявність гетерозиготної делеції 9p21 у 2 досліджених метастатичних ушкодженнях.

Аналіз HER-2/neu статусу ІГХ та FISH дослідженням в усіх випадках показав негативні результати (рис.6.9).

Дані ІГХ та FISH досліджень для сприятливих імунофенотипів клініко-морфологічного синдрому «РНПЛ» узагальнені в таблиці 6.1.

Резюме. Карциноми невідомого первинного походження складають дуже неоднорідну за гістологічними, імуногістохімічними та молекулярно-генетичними характеристиками групу, тому оцінка первинного анатомічного місця походження повинна включати інвазивні дослідження з біопсією та аналізами на основі гістологічних зрізів, такими як ІГХ та FISH.

З 61 випадку РНПЛ, ядерно-цитоплазматична експресія p16INK4A виявилась у 31 з 61 (50,8 %) хворих, які на FISH дослідженні підтвердились лише в 28 спостереженнях – 9 гомозиготних та 19 гетерозиготних делецій 9p21, що зустрічались у всіх досліджених фенотипах клініко-морфологічного синдрому «РНПЛ», окрім низькодиференційованої карциноми з розподілом по середній лінії тіла (екстрагональний зародково-клітинний синдром).

Експресія HER-2/neu виявилась позитивною (2+/3+) в 15 з 61 (25 %) РНПЛ, але тільки в 9 з них мала дійсну ампліфікацію гена ERBB2 на FISH в фенотипах низькодиференційованої карциноми з розподілом по середній лінії тіла; жінок з папілярною аденокарциномою черевної порожнини; жінок з аденокарциномою, що уражує тільки аксиллярні лімфатичні вузли; низькодиференційованої нейроендокринної карциноми (але які мали вірогідне походження з молочної залози) та аденокарциноми з профілем товстої кишки [СК 7 (-), СК 20 (+), CDX-2 (+)].

Таблиця 6.1 – Порівняння результатів імуногістохімічних та FISH досліджень p16^{INK4A} та HER-2/neu в сприятливих фенотипах синдрому «Рак невідомої первинної локалізації», n, %

Імунофенотип клініко-морфологічного синдрому «РНПЛ»	n, (%)	p16 ^{INK4A}		HER-2/neu	
		ІГХ (я/ц +)	FISH (делеція 9p21)	ІГХ (2+,3+)	FISH (ампліфікація ERBB2)
Екстрагональний зародково-клітинний синдром	3 (4,9)	0	0	1	1
Жінки з папілярною аденокарциномою очеревини	6 (9,8)	4	3*	2	2
Жінки з метастазами аденокарциноми в однобічних аксилярних лімфатичних вузлах	5 (8,2)	3	1+2*	3	2
Анонімні метастази плоскоклітинної карциноми в лімфатичні вузли ший	12 (19,7)	6	4+2*	1	0
Ізольована пахова аденопатія (плоскоклітинна карцинома)	9 (14,7)	5	2+2*	2	0
Низькодиференційована нейроендокринна карцинома	10 (16,4)	2	2*	2	1
Чоловіки з бластними метастазами кісток і підвищенням рівня сироваткового PSA	4 (6,5)	2	1*	0	0
Аденокарцинома з колоректальним профілем [СК20+, СК7-, CDX-2+]	9 (14,7)	7	1+4*	4	2
Аденопатія з клітин Меркеля	3 (4,9)	2	2*	0	0
Всього:	61 (100)	31 (50,81)	9+19* 28 (45,90)	15 (24,59)	9 (14,75)

Примітка. РНПЛ - раки невідомої первинної локалізації, ІГХ – імуногістохімічне дослідження, FISH – флуоресцентна гібридизація in situ, PSA – простат специфічний антиген, я/ц – ядерно-цитоплазматична експресія, * - гетерозиготні делеції 9p21.

Невелика кількість спостережень метастатичних карцином з ампліфікацією гену ERBB2 робить його більш специфічним для FISH диференційної діагностики фенотипів клініко-морфологічного синдрому «РНПЛ», порівняно із делецією 9p21 (p16^{INK4A} / CDKN2A), що вірогідно носить універсальний характер набуття інвазивного та дисемінованного перебігу карцином різних локалізацій.

Основні положення цього розділу опубліковані в 1 статті [233] та 1 тезі [234].

РОЗДІЛ 7

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Раки з невідомою первинною локалізацією (РНПЛ) включають неоднорідну сукупність метастатичних неоплазій, для яких стандартний клінічний алгоритм обстеження не допоміг знайти джерело виникнення пухлини. За даними літератури, на клініко-морфологічний синдром «РНПЛ» припадає біля 3 % - 5 % всіх злоякісних пухлин в розвинутих країнах (США, країни Європи) і трохи більше у країнах з обмеженими діагностичними можливостями в сфері охорони здоров'я [10].

Тому ІГХ метод стає провідним в дослідженні шляхів канцерогенезу та походження РНПЛ. В сучасних керівництвах та монографіях з ІГХ описані алгоритми діагностики складних для верифікації випадків пухлин з використанням антитіл первинної ІГХ панелі, що на підставі визначення складу проміжних філаментів (цитокератинів, віментину, нейрофіламентів, тощо) розділяє їх за походженням: на епітеліальні (Pan CK AE1/3 +), мезенхімальні (Vimentin +), гемопоетичні (CD 45 +) або меланоцитарні (S100 і HMB45 +) [22, 25]. Але рекомендації з використання сукупності морфологічних та морфометричних характеристик метастазів з невідомого первинного джерела і досі неточні та деяким часом суперечливі, що залишає їх дослідження актуальним і до теперішнього часу.

Нові уявлення про механізми метастатичного початку в раках також пропонують пояснювальні моделі загадкового явища невизначної первинної локалізації. Експериментальні дані моделей тварин хворих на рак молочної залози свідчать про те, що метастатичне поширення має місце на ранніх стадіях еволюції пухлини. В цих моделях інвазивні ранні пухлинні клітини, які генетично менш розвинені та з проявами стовбурових клітин, здатні мігрувати гематогенно як дисеміновані ракові клітини та виявляють метастази раніше ідентифікації первинного раку. Мабуть, ці ранні дисеміновані ракові клітини мають потенціал перемикатись між програмами міграції, спокою та

розповсюдженням. Ця концепція раннього розповсюдження пухлинних клітин передбачає подальше незалежне прогресування первинної пухлини та метастазів, які одночасно зростають під тиском селекції імунної системи та відповідного мікросередовища. Під цим кутом РНПЛ можна розглядати як край незалежної паралельної еволюції, де метастази значною мірою переросли первинну пухлину. З цієї точки зору можна також припустити, що РНПЛ мають ранню фазу розповсюдження дисемінованих ракових клітин, як об'єднуючу біологічну особливість [92].

Підходи до діагностики пацієнтів з підозрою на РНПЛ мінялися на протязі років із можливостями технічних засобів медицини. Якщо проаналізувати літературу останніх десяти років, починаючи із 2008 року рекомендації провідних дослідників змінюються від ІГХ маркерів широкої панелі до використання tissue-of-origin (ToO) тесту із quantitative real-time PCR (qRT-PCR) тестом в 2013 року [60].

Але все одно перед продовженням більш глибокого специфічного аналізу необхідне проведення ексцизійної, післяопераційної або звичайної біопсії новоутворення, як це робилось багато десятиліть. В нашому дослідженні запропонований підхід оцінювання зрізів рутинного забарвлення гематоксилін-еозин в програмі для аналізу цифрових зображень ImageJ з об'єктивним аналізом параметрів, що мають значення під час оцінювання на «око» - розмір ядер клітин, їх форма та скупченість. Це дозволяє об'єктивно відповісти на питання стосовно дрібності або великоклітинності паренхіматозного компонента.

Для розробки підходу до комплексної оцінки морфометричних, морфологічних та імуногістохімічних характеристик пухлин без відомої первинної локалізації було проаналізовано 41 спостереження непластичних уражень лімфатичних вузлів шиї з подальшим поділом їх на підгрупи за експресією ІГХ маркерів первинної панелі [Pan CK AE1/3, Vimentin, CD45, S100 i/або НМВ45] та параметрами ядер клітин – площа, периметр та «коефіцієнт круглості» в порівнянні з розмірами звичайних лімфоцитів, які є тканиною мікро-

оточення у випадках метастатичного ураження лімфатичних вузлів, що може слугувати еталоном в оцінюванні відносних розмірів клітин метастазів. На сьогодні розміри так званих *small round blue cell tumors* (дрібно-кругло-синьо-клітинних пухлин), що складаються з відносно невеликих однорідних недиференційованих клітин, описуються, як ті, які мають дещо більший або подвійний розмір еритроцитів у мазках, висушених на повітрі. На практиці користування таким «еталоном» дуже сумнівне, а первинне та вкрай важливе оцінювання «гематоксилінів-еозинів» на предмет дрібності, круглості та поліморфізму клітин є суб'єктивною думкою кожного конкретного фахівця. Тому так часто виникають суперечки щодо попереднього діагнозу недиференційованих (анапластичних) пухлин, останню крапку в діагнозі яких не завжди може поставити навіть імуногістохімічне дослідження.

Принципові питання, на які повинен відповісти патоморфолог під час діагностики метастатичних пухлин, це первинна пухлина чи метастаз, далі, якщо метастаз, то звідки (гістогенез) та які характеристики цього непластичного процесу можуть суттєво вплинути на тактику лікування або прогноз (гормональний статус, інвазія, проліферативна активність, тощо).

За первинною панеллю ІГХ маркерів всі пухлини можна поділити на [Pan CK AE1/3 (+), Vimentin (-), CD45 (-), S100 (-)] – більшість карцином, первинна локалізація яких і стає діагностичною проблемою, але треба враховувати, що частина карцином продукує Vimentin (+) компонент паренхіми (в першому етапі нашого спостереження ця частка склала 28,57 % від всіх метастазів карцином, і включала папілярний рак щитоподібної залози, світлоклітинну нирковоклітинну карциному та низькодиференційований рак). [Pan CK AE1/3 (-), Vimentin (+), CD45 (+), S100 (-)] – лімфопроліферативні стани, які потребують не виявлення локалізації, а верифікації імунофенотипу за кластерами диференціації (CD). [Pan CK AE1/3 (-), Vimentin (+), CD45 (-), S100 (+) і/або HMB45 (+)] – меланоми, але згідно багатьох досліджень маркери Vimentin та S100 є досить неспецифічними навіть разом (позитивними є нейробластома, міксоїдна ліпосаркома, мезенхімальна хондросаркома – в хонд-

роїдному компоненті, гастроінтестинальна стромальна пухлина, шванома) доцільно в первинну панель додати маркер премеланосом НМВ 45, або замінити ним S100, тому що в нашому випадку він продемонстрував 100 % специфічність на пухлини меланоцитарного походження.

Таким чином після морфометричного дослідження в програмі ImageJ та первинної панелі ІГХ [Pan CK AE1/3, Vimentin, CD45, S100 і / або НМВ 45] відокремились підгрупи за розмірами та імунофенотипами (рис. 7.1).

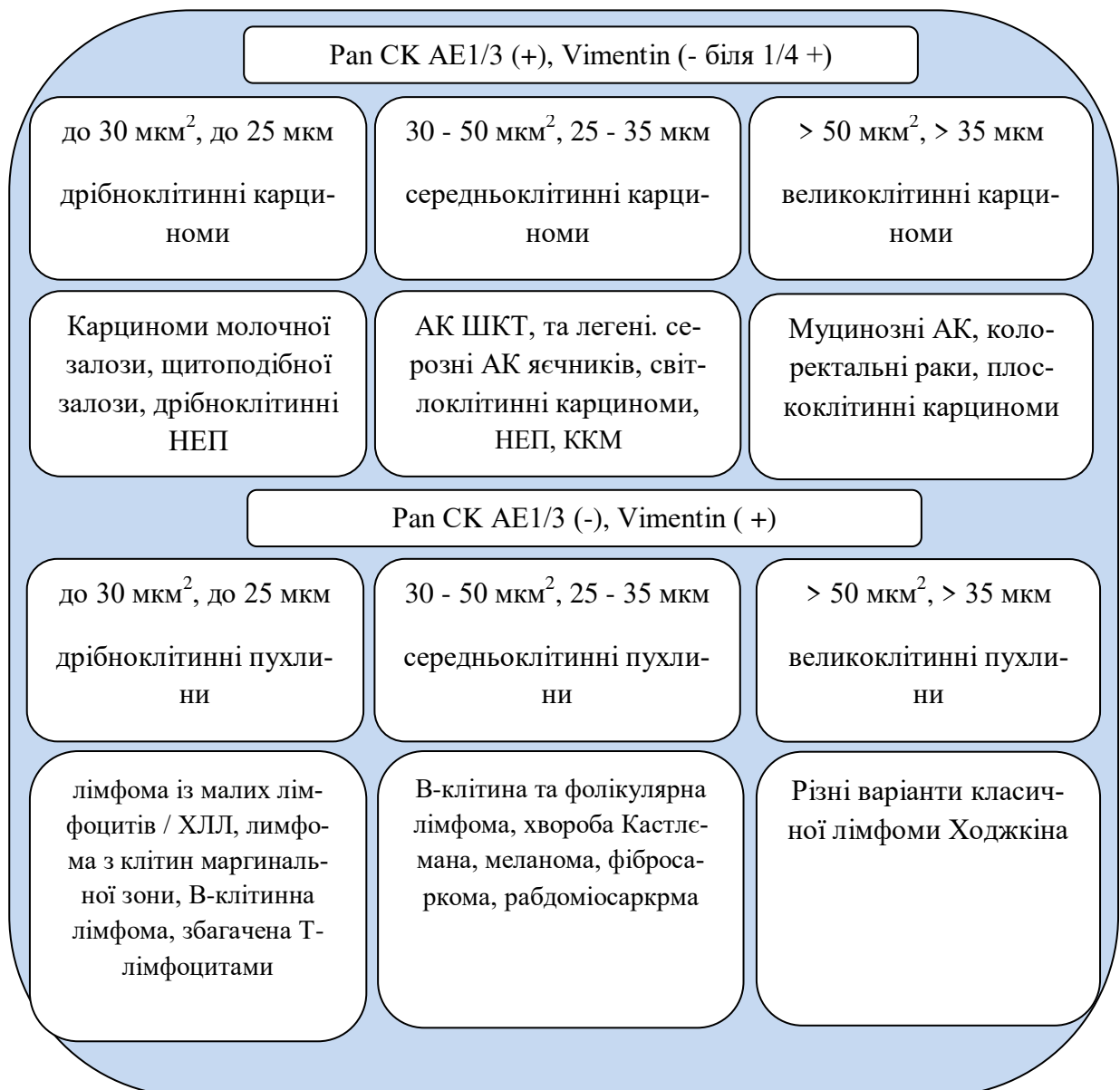


Рисунок 7.1 – Розподіл нозологічних одиниць онкозахворювань за алгоритмом поєднання імуногістохімічного та морфометричного дослідження.

Клініко-морфологічний синдром «РНПЛ» включає безліч варіантів метастатичного ураження, але з метою структуризації відокремлюють сприя-

тливі та несприятливі фенотипи, з яких аденокарциноми займають більшу частину спостережень [10]. Сприятливі фенотипи підпадають під терапевтичні заходи місцево-поширених форм, що покращує п'ятирічну виживаність пацієнтів.

При лікуванні папілярного канцероматозу черевної порожнини без первинної локалізації у жінок за стратегією 2013 року як III клінічну стадію раку яєчників, покращення виживаності виникає звичайно у випадку, якщо це і є метастазом серозної аденокарциноми яєчників [235-237]. Взагалі лікування раку яєчників набуло покращення останні десятиліття через комбінування платино-вмісної хіміотерапії, що ефективно працює в дисемінованих формах карцином та герміногенних пухлин [105].

Ця категорія РНПЛ припадає 100 % на жінок у віці 55-65 років, як уже було визначено гістологічним підтипом такого РНПЛ є виключно серозні аденокарциноми. Серозний папілярний перитонеальний карциноматоз також часто в літературі асоціюється із первинною черевною карциномою [238-239]. Дослідження серії систематичних оглядів таких хворих зазначило, що найбільш відомими клінічними маніфестаціями були болі, ураження органів черевної порожнини, асцит та кишкова непрохідність. Хвороба поширюється в основному до очеревини, мезентеріальних та очеревинних поверхонь живота або тазу [238]. Папілярний серозний аденоканцероматоз гістологічно характеризується наявністю псаммомних тіл з імуногістохімічним вираженням MUC-16 (CA-125), рецепторів естрогенів, мезотеліну, WT-1, PAX-8, CK 7 та p53. Підвищена концентрація MUC16 в сироватці крові описується у 70-90 % хворих [238].

Але цей діагноз може іноді викликати значні сумніви, тому, що часто метастази первинних ендометріальних, гастро-інтестинальних та панкреато-біліарних АК повторюють мікроскопічні, макроскопічні та/або імуногістохімічні ознаки первинних муцинозних АКЯ. Хоча більшість серозних та ендометріюїдних пухлин яєчників експресують PAX-8 та естрогенові рецептори,

ці маркери нечасто експресовані в первинних муцинозних пухлинах (пограничних цистаденомах або аденокарциномах) [239-240].

Втрата DPC4 імунореактивності виключає зазвичай первинну пухлину яєчників і віддає перевагу походженню із підшлункової залози, але така мутація із втратою зустрічається лише в половині аденокарцином підшлункової. Коекспресія або втрата СК 7 та СК 20 із варіабельною імунореактивністю CDX-2 часто мають муцинозні аденокарциноми яєчників, колоректальні та шлункові аденокарциноми. В додаток СК 7 може експресуватись навіть в ендocerвікальних АК [241-242].

В нашому дослідженні після другого етапу ІГХ серед всіх ізольованих папілярних канцеромаозів тільки 20,83 % відповідали фенотипу серозної естроген-залежної АК з яєчників (5 із 24) з [СК 7 (+), СА-125 (+), СК 20 (-), ER (+), Vimentin (-), WT-1 (+), PAX-8 (+)], що своїми морфометричними показниками були подібні до спостережень серозних АК групи порівняння первинних пухлин яєчників. Муцинозні та низькодиференційовані форми, що також могли походити з яєчників, нажаль, не мають ефективності в лікуванні [243-244].

Стосовно порівняння серозних аденокарцином яєчника та канцероматозу очеревини варіанту “high-grade” з інтраепітеліальною неоплазією маткової труби, подібність імуногістохімічного профілю, послідовна зміна гормонального статусу та надекспресія p53 в усіх цих групах довела наявність єдиного шляху канцерогенезу.

Але деякі автори також висловлюють думку про неможливість поєднання понять серозний канцероматоз та серозні аденокарциноми яєчників [245-246]. Їх заключення базується на різних закономірностях втрати гетерозиготності в декількох хромосомних локусах при серозному канцероматозі, що відрізняються від тих, що виявляються при карциномі яєчників [245]. Згідно літературних джерел, надекспресія онкогену HER-2/neu зустрічається частіше при серозних канцероматозах, що ми також продемонстрували в нашому дослідженні [247]. ІГХ експресія HER-2/neu виявила можливу

ампліфікацію (градації 2+/3+) тільки в групі 2 з АКЯ 16,67 % й в групі 3 ІПК - 33,33 %, що приблизно в 2 рази більше, ніж в групі первинних АКЯ.

Протягом останніх трьох десятиліть розуміння біології та шляхів поширення пухлин з внутрішньочеревним розповсюдженням та розуміння захисної функції перитонеального бар'єру проти пухлинного посіву підштовхнули концепцію того, що папілярний канцероматоз є локо-регіональною хворобою: у відсутність інших системних метастазів, запропоновані мультимодальні підходи, що поєднують агресивну циторедуктивну хірургію, інтраперитонеальну гіпертермічну хіміотерапію та системну хіміотерапію, і насправді розглядаються як перспективні методи поліпшення місцевого контролю захворювання та, зрештою, збільшення виживання. Привілеї інтраперитонеальної гіпертермічної хіміотерапії полягають у збільшенні локальної регіональної концентрації лікарських засобів, що обмежує їх системну дифузію, а отже, і їх токсичність та побічні ефекти. Важливою є роль перитонеального плазмового бар'єру у сприянні локо-регіональному впливу високих доз. Дійсно, очеревина має здатність обмежувати системну дифузію лікарських засобів в області очеревини. Крім того, гіпертермія підвищує ефективність та проникнення багатьох використовуваних ліків.

Незважаючи на ефективний метод хіміотерапевтичної циторедукції і випадкові довгострокові ремісії, пацієнти з РНПЛ виживають на кілька місяців менше, ніж хворі на рак яєчників. Таким чином, довготривалі та детальні клініко-морфологічні дослідження, що захватять пацієток з карциномами яєчників і серозним канцероматозом очеревини можуть пролити подальше світло на наявність або тонких молекулярних відмінностей між раком яєчників і його більш агресивним фенотипом, первинним раком очеревини. Наприклад, роль онкомаркери р16, що активно досліджується не тільки в епітеліальному компоненті, а і в стромі карцином жіночої репродуктивної системи [248-249]. До того ж, залишається актуальним диференційна діагностика з злоякісним асцитом непапілярного серозного варіанту аденокарциноми. Що ми продемонстрували в дослідженні: після серозної естроген-залежної кар-

циноми друге місце поділили між собою фенотип [СК 7 (+), СА-125 (+), СК 20 (-), ER (-), Vimentin (-), WT-1(-)]: естроген-незалежної аденокарциноми (яєчника?) з огляду на те, що СА-125 може експресуватись пухлинами інших локалізацій) та мішані фенотипи: [СА-125 (-), СК 7 (+), СК 20 (+/-), WT-1 (-), ER (-), CDX-2 (+/-), PAX-8 (-)] вірогідно з ШКТ, що робить прогноз лікування таких непередбачуваними, і їх можна віднести в категорію «підтвержені РНПЛ».

В літературі, розрізняють карциноматоз перитонеальних поверхонь будови папілярної і непапілярної серозної аденокарциноми. Остання виникає внаслідок метастазування чи імплантації пухлин шлунково-кишкового тракту, а також з інших прихованих локалізацій. Морфолог повинен підозрювати шлунково-кишкове походження у пацієнтів з муциноутворюючою аденокарциномою, або перстень-подібноклітинним варіантом недиференційованого раку. Морфометричне дослідження цих гістологічних варіантів показало значно більші площі та периметри ядер клітин, порівняно з серозними папілярними варіантами, що можна використовувати на етапі вибору вторинної імуногістохімічної панелі.

За даними ВООЗ, рак молочної залози займає провідне місце в структурі онкозахворюваності жіночого населення, в Україні на 2018 рік показники захворюваності і смертності становлять 43,9 та 15,6 на сто тисяч населення відповідно [127]. Дослідження територіальних особливостей захворюваності жіночої популяції України на рак МЗ показує територіальну залежність областей південно-східного регіону (куди входить і Дніпропетровська область) з найвищими показниками як захворюваності, так і смертності. Скоріше за все через високий рівень забруднення середовища канцерогенними речовинами в наслідок активної промисловості нашого регіону [127]. Особливо непокоїть те, що співвідношення між кількістю жінок, що захворіли, і кількістю тих, що померли, в Україні є гіршим, ніж у країнах Західної Європи [123].

Вибір лікування дисемінованих форм карцином МЗ залежить від прогнозування метастатичного розповсюдження пухлини. Але поширення пухлинного процесу відбувається завдяки різноманітним процесам, про що говорять останні публікації, присвячені цій проблемі [123]. Визначаються ожиріння, вік менопаузи, підвищена експресія альдегіддегідрогенази-1, ліпопротеїємія, а також метастазування первинної пухлини МЗ у кістки зумовлюють підвищена експресія інсуліноподібного фактора росту-1, фактор росту тромбоцитів, фактор росту ендотелію судин (VEGF), епідермальний фактор росту, інтерлейкін-6, -8, -11, -1, матриксні металопротеїнази, інтегрин $\alpha\beta3$, катепсин К, кісткові морфогенетичні білки, епітеліально- мезенхімальний та мезенхімально-епітеліальний переходи [123]. В той же час є дані, що вік жінки, локалізація раку МЗ у правій або лівій грудній залозі, кількість уражених метастазами регіонарних лімфатичних вузлів не впливають на його прогресію, але карциноми МЗ частіше метастазують у кістки, печінку та легені [95].

Дисемінація раку МЗ супроводжується змінами в адаптивній імунній системі, але незважаючи на велику кількість опублікованих даних, до сих пір залишається неясним, які з імунологічних показників можна використовувати в якості прогностичних факторів [250]. Разом з тим відомо, що реакції окремих ланок імунної системи об'єктивно відтворюють прогноз онкозахворювання, а імунотерапія покращує результати основного лікування хворих на карциноми МЗ [250].

Доведення відповідності карцином невідомої первинної локалізації з ураженням ізольованих однобічних аксиллярних лімфатичних вузлів у жінок карциномам з молочної залози стало метою дослідження цього фенотипу в нашому дослідженні. Морфометричні показники на рівні $41,1 \pm 9,6$ за площею, $25,5 \pm 2,9$ за периметром, $0,70 \pm 0,12$ за коефіцієнтом круглості та фенотип [Pан СК AE1/3 (+), СК 7 (+), ER (+), PGR (+), HER-2/neu (+ або -), PAX-8 (-)] мали місце в первинних випадках АК МЗ. Подібно до первинних пухлин молочної залози, метастатичні карциноми мали морфологічну будову і показники площини, периметру та круглості ядер (всі $p > 0,05$), але відрізнялися розподі-

лом фенотипів за комбінацією прогностичних маркерів діагностики РМЗ – [ER, PGR, HER-2/neu], а саме метастатичні карциноми мали більше спостережень [ER+, PGR-, HER-2/neu-] та [ER-, PGR-, HER-2/neu+] фенотипів (18,18 % проти 12,50 % і 13,64 % проти 4,17 %) відповідно. До того ж, в первинних РМЗ люмінальний тип А мав значну більшість (60,42 % проти 36,36 % метастатичних АК), а в метастатичних значно підвищився рівень люмінальних карцином типу В (13,64 % проти 4,17 % первинних АК).

ІГХ методом розрізняють 2 групи карцином МЗ з позитивним статусом ER, що належать до люмінальних підтипів А і В. Для люмінального А карцином характерні високо експресуючі рецептори естрогенів / прогестеронів та низький індекс проліферації, що виражається експресією білка Ki-67 не більш ніж у 20 %. Гормонзалежні пухлини з показником Ki-67 вище 20 % та/або з гіперекспресією рецептора епідермального фактора росту (HER-2/neu) відносять до люмінального типу В, що має агресивніший перебіг та гірший прогноз, ніж люмінальний тип А [251-256]. Але відомо, що лише 40 % пацієток з люмінальними типами РМЗ позитивно реагують на протигормональну терапію, у інших за різних факторів розвивається резистентність [251, 257-261]. «Три-негативні» спостереження раку МЗ, що зустрічались в обох групах й відповідали низькодиференційованим АК і недиференційовані раки, часто потрапляють в категорію анапластичні пухлини невідомого походження через відсутність органоспецифічних маркерів і мають високу резистентність до терапії [259].

Рак передміхурової залози – найпоширеніша злоякісна пухлина чоловіків у країнах Західної Європи, в тому числі й України [262-267]. У нашому дослідженні крім підвищення загального PSA в крові враховували ІГХ профіль метастазів раку простати у кістки, що передбачав як маркери виключення Vimentin (мезенхімальні пухлини), CD45 (лімфопроліферативні стани), S100 (меланома), CK 7 і CK HMW (карциноми інших локалізацій), так і маркери підтвердження епітеліального походження метастазу – Pan CK AE1/3 поряд з органоспецифічними – PSA, CK 8/18, AR, AMACR (p504s). Такий

широкий спектр первинних антитіл для метастазів РП без первинної локалізації показав себе необхідним через втрату диференціювання і був підтверджений роботами інших дослідників [268-273]. Riccioli A. і співавт. (2015), досліджуючи спектр карцином синдрому «РНПЛ», підкреслюють діагностичну важливість цитокератинів [Pan CK AE 1/3, CK 7, CK 8/18, CK 19, CK HMW та CK 20] для верифікації джерела походження метастатичної карциноми [161]. E. A. Szwed і співавт. (2015) продемонстрували 3 випадки вторинних метастатичних пухлин у кістках на тлі хіміотерапевтичного лікування первинного РП, що без ІГХ були розцінені як його метастази [162]. У нашому дослідженні виявили неспецифічна для раку передміхурової залози експресія CK 7, CK 20, CK HMW в окремих низькодиференційованих метастазах кісток, що дало можливість враховувати це в практичній роботі і звертати більшу увагу на позитивність органоспецифічних – PSA, CK 8/18, AR, AMACR (p504s), та їх співвідношення у сумнівних випадках.

Треба наголосити, що така нечітка позиція щодо експресії цитокератинів або органоспецифічних AR метастазами рак простати зумовлює пошук нових діагностичних критеріїв. Нещодавно здійснили дослідження та встановили низку додаткових біомаркерів для раку передміхурової залози. Так, Li D. і співавт. (2018), які досліджували алкалінову фосфатазу (serum alkaline phosphatase – ALP), свідчать про її великий потенціал у прогнозі раку простати. З їх роботи видно, що рівень ALP у сироватці крові – широко використовуваний показник для захворювань печінки, ураження кісток та ефектів лікування [166].

Завдання покращити критерії верифікації метастазів раку простати у кістки з погляду діагностики раків без первинної локалізації в нашому дослідженні вирішено шляхом морфометричного дослідження пухлинних клітин на предмет розмірів площі, периметра та круглості ядер у програмі ImageJ. Це дало змогу за наявності подібних ІГХ фенотипів метастатичних і первинних раків передміхурової залози об'єктивно продемонструвати зменшення ядер клітин метастатичних карцином до розмірів лімфопроліферативних за-

хворювань, що часто призводить до діагностичних помилок без використання ІГХ і відповідного анамнезу при рутинному морфологічному забарвленні гематоксиліном-еозином. ImageJ як програма вільного доступу для аналізу цифрових зображень має безліч переваг і використовується в багатьох сучасних дослідженнях для вимірювання морфологічних об'єктів або навіть будівництва 3D моделей [183-186], але щодо порівняння розмірів ядер метастатичних і первинних АК передміхурової залози використана вперше.

Колоректальна карцинома відповідальна щорічно за 774,000 нових смертей за даними ВООЗ 2017 року [274-275]. Найефективнішим підходом в лікуванні вважається комбінація з оперативного втручання, хіміо- та променевої терапії, але якщо первинне джерело раку колоректального профілю не знайдено, виживаність пацієнтів різко знижується [276]. Канцерогенез колоректального раку (КРР) – це стадійний процес набуття хромосомної нестабільності, мікросателітної нестабільності та метілювання острівця CpG. За даними літератури, хромосомна нестабільність КРР відбувається за рахунок мутації K-ras, втрати p53 та гетерозиготності за довгим плечем 18 хромосоми. 65-70 % такого канцерогенезу відповідає за спорадичне виникнення КРР та сімейний аденоматозний поліпоз [277-283].

Це підтверджують результати нашого дослідження, ядерна транлокація β-катеніну, позитивна «фокальна» експресія p53 статистично достовірно зустрічаються частіше в метастазах колоректального фенотипу, порівняно із первинними АК товстої кишки.

Проаналізувавши клінічні та патологоанатомічні особливості первинних локалізацій КРР, за даними останніх досліджень, визначається різниця в профілі мутацій, епідеміології та прогнозі, пухлин розташованих праворуч чи ліворуч, а саме проксимальні відділи (розташовані праворуч) більш вірогідно будуть гіперметильовані та мати мікросателітну нестабільність, порівняно із карциномами дистальних відділів [171-172]. В нашому дослідженні позитивна фокальна експресія p53 була знайдена в ККР сліпої кишки (2), висхідного відділу клубової кишки (2), клубової кишки (з печінкового кута) (1) сигмопо-

дібної кишки (3) та прямої кишки (1), тобто також частіше в проксимальних відділах, але розподіл за локалізаціями не показав статистично вірогідної різниці, можливо через недостатньо велику вибірку.

Стосовно іншого шляху канцерогенезу, ядерна транлокація β -катеніна виявилась в половині випадків метастазів КРР та тільки в 5 з 41 (12 %) первинних КРР, що підтверджує думку про зв'язок активної дисемінації ККР із активацією Wnt-сигнального шляху, що описують в літературі [283-284].

Не зважаючи на чисельні підходи до ведення пацієнтів з метастатичними КРР [284], продовжуються активні дослідження для підвищення ефективності можливої імунотерапії АК товсто кишкового профілю [285-289], навіть зустрічаються оригінальні роботи, наприклад, про роль жирової тканини, як мікрооточення при раці колорекальної ділянки [290].

За даними Imaniur R. та співавт. (2018) тільки 1-5 % пухлин з герміногенних клітин мають екстрагонадне розташування, що уражує серединну лінію тіла з локаціями в передньому середостінні (50-70 %), ретроперитоніальній ділянці, епіфізі, крижово-куприковому регіоні та піхві [289]. Й не залежно від місця всі пухлини з герміногенних клітин ділять на семіноми/герміноми та несеміноми, що принципово впливає на тактику лікування [101-102]. Фенотип низькодиференційованої карциноми з розподілом за середньою лінією тіла (екстрагонадний зародково-клітинний синдром) із сприятливих варіантів синдрому «Рак невідомої первинної локалізації» вірогідно включає в себе ембріональну карциному та мішані з нею форми, що мають декілька компонентів: гермінома + ембріональна карцинома, пухлина жовткового мішку + ембріональна карцинома [292]. В нашому дослідженні визначились ПХ профілі чистих варіантів гонадних та екстрагонадних пухлин з герміногенних клітин: семіноми/герміноми мали найбільший відсоток експресії PLAP і CD117, а ось експресія маркерів CD30, EMA і CK AE1/3 виявилась діагностично значущою в зразках ембріональної карцином та її компонентах мішаних варіантів, α FP-позитивне фарбування було показовим для пухлин жовткового мішка. Треба відзначити, що в літературі для діагностики

семіном використовують також досить новий маркер OCT3/4, що в ембріональній карциномі та пухлині жовткового мішку здебільшого має негативне фарбування [101-102]. В МФМ показниках найбільших розмірів сягали семіноми / герміноми (більше ніж в~ 3 рази за площею та~ 2 рази за периметром перевищували показники ЗЛ), потім йшли зразки ембріональної карцином (в~ 2,1 рази за площею та ~ 1,7 за периметром перевищували показники ЗЛ) і найменшими показники були для пухлин жовткового мішка (в~ 1,7 рази за площею та~ 1,5 за периметром перевищували показники ЗЛ), при цьому коефіцієнти круглості виявились непоказовими для їх диференційної діагностики. Такі дані вперше зустрічаються в дослідженнях.

Плоскоклітинні раки голови та шиї мають форму імунофентипу синдрому «Рак невідомої первинної локалізації» через можливість анонімних метастазів в лімфатичні вузли шиї. За даними літератури, найчастіше пухлини локалізуються у носоглотці (75–95 %) та верхньощелепній пазусі (65–80 %), на 2 місці - комірці гратчастого лабіринту і порожнина носа (10–23 %), рідше за інші уражуються навколоносові синуси, лобова й основна пазухи (1–2 %) [293]. Особливості анатомічної будови, що зумовлені наявністю різноманітних тканин, безліччю малих слинних і слизових залоз, скупчень лімфатичної тканини, пояснює різноманіття гістологічних форм пухлин голови та шиї. Найчастіше виявляють епітеліальні пухлини, серед яких провідне місце займає саме плоскоклітинний рак (ПР) (більше половини хворих) [293]. Процик В. С. із співавт. (2013) стверджують, що ПР ротової порожнини і ротоглотки характеризуються високою частотою (до 50 – 70 %) метастазування в лімфатичні вузли шиї, що є «сторожовими» лімфатичними вузлами для цієї локалізації [294]. Результати лікування місцево-розповсюджених форм раку голови та шиї залишаються незадовільними, незважаючи на комбінацію променевої терапії разом із неоадьювантною [295]; тому останні десятиріччя присвячені пошуку ІГХ особливостей агресивних форм ПР голови та шиї й ланок для таргетної терапії [136, 139-140, 296]. До таких ІГХ маркерів відноситься p16, що може стати непрямим свідком папіломовірусної інфекції та довести на-

лежність метастазу ПР в лімфатичний вузол шиї до раку ротоглотки. В нашому дослідженні маркер p16 показав виключно інтрануклеарний характер поодиноких клітин в спостереженнях ПР гортані, шкіри обличчя та нижньої губи (негативний результат) та змішану ядерно-цитоплазматичну реакцію скупчень клітин «блоків» (позитивний результат) в 57,14 % ПР ротоглотки та 40,00 % ПР верхньощелепної пазухи з групи ПР голови та шиї відомих локалізацій. Стосовно метастатичних ПР p16 (+) нами знайдено було тільки 8,57 % (3 з 35) позитивних спостережень (2 жінки і 1 чоловік), що дало можливість припустити первинне джерело ПР в ділянках ротоглотки або пазухи верхньої щелепи.

Члени сімейства Papillomaviridae відіграють важливу роль у розвитку ПР ротоглотки та аногенітальної зони. Участь ВПЛ у канцерогенезі ПР ротової порожнини та ділянки глотки вжають імовірною на основі вірусного тропізму до епітеліальних клітин та онкогенного потенціалу генотипів ВПЛ високого ризику в патогенезі аногенітальної неоплазії, особливо при плоскоклітинному раку шийки матки та морфологічних подібностях між орофарингеальним та генітальним епітелієм [132-133, 297].

За даними Національного канцер-реєстру України, захворюваність на рак шийки матки займає 2 місце у структурі онкозахворюваності жінок у віці 30-54 років, а також 2 місце в структурі смертності від злоякісних новоутворень жінок у віці 18-54 років [149]. Доведено, що основним етіологічним фактором раку шийки матки є вірус папіломи людини (ВПЛ) високого онкогенного ризику: 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 та 70 типу. Цікаво, що ВПЛ 16 типу та філогенетично рідні 31, 33, 35, 52, 58 типи вірусів індукують розвитк ПР, в цей час як ВПЛ 18 типу та 39, 45, 59 і 68 типів індукують розвиток АК шийки матки [149-150].

На сприятливий фенотип синдрому «Рак невідомої первинної локалізації», як метастазування ПР в паховий лімфатичний вузол, в нашому дослідженні у жінок приходиться більше спостережень ніж у чоловіків (57,14 % проти 25,00 %) з імунофенотипом СК НМВ (+) / p63 (+) / p16^{INK4A} (+ для жі-

нок, - для чоловіків) / з найбільшим розміром ядер клітин ПР, порівняно з метастазами інших карцином. До того ж серед 14 метастатичних уражень жінок після ІГХ виявилось 50,0 % (7 з 14) «попередніх РНПЛ» другої категорії, 42,86 % яких своєю первинною локалізацією завдяки p16^{INK4A} (+) фенотипу походили з репродуктивної системи (4 p16^{INK4A} (+) ПР шийки матки, 2 p16^{INK4A} (+) серозних АКЯ), що підтверджують і інші автори [298-299].

Фенотип низькодиференційованої нейроендокринної карциноми (НЕК) із сприятливих варіантів синдрому «Рак невідомої первинної локалізації» проходить лікування як дрібноклітинний рак легенів [292, 300]. Але далеко не всі метастатичні НЕК мають позитивне TTF-1 фарбування для підтвердження такого походження. Маркер TTF-1 (thyroid transcription factor-1, інша назва NKX2-1) є транскрипційним фактором, що активує експресію генів в щитоподібній залозі (в фолікулярних та парафолікулярних С-клітинах). TTF-1 також грає важливу роль в регулюванні процесів транскрипції в ЦНС та клітинах легенів [301]. Стандартне ІГХ використовує TTF-1 для діагностики приблизно 80 % бронхо-легеневих АК та дрібноклітинних карцином легенів (до 20 % мають TTF-1 негативний статус), а також папілярної, фолікулярної й медулярної карциноми щитоподібної залози. Але, не зважаючи на те, що фактор транскрипції щитоподібної залози 1 (TTF-1) відіграє ключову роль у морфогенезі легенів і виражається у близько 90 % легеневих дрібноклітинних карцином, він, наприклад, також експресується в змішаних ендокринно-екзокринних карциномах загальної жовчної протоки [301].

Позитивність TTF-1 при легеневих та позалегеневих НЕП активно дискутується в літературі, описуючи, що експресія TTF-1 при НЕП дрібноклітинного типу не є рідкістю у позалегеневих локалізаціях. Тому результати ІГХ щодо TTF-1 в метастазах з невідомого первинного джерела слід трактувати обережно і постійно вдосконалювати диференційно-діагностичні алгоритми, поширюючи ІГХ панелі органоспецифічними маркерами та морфометричними показниками ядер клітин [301-304].

Клініко-патологічні особливості карциноми з клітин Меркеля (ККМ) включають: три гістологічних підтипи - трабекулярний, перехідний та дрібноклітинний, хоча використання цієї класифікації чітко не зрозуміло [305]. Трабекулярний тип, який є найбільш диференційованим, є рідким та часто видимий тільки в мішаних пухлинах. Перехідний тип характеризується базофільним ядром з високим мітотичним індексом та найбільш частий. Дрібноклітинний тип є недиференційованим і невизначеним від дрібноклітинної карциноми інших анатомічних місць наприклад легенів. Гістопатологічні характеристики ККМ включають гіперхромні ядра та високий мітотичний індекс. Імуногістохімічне дослідження включає позитивне забарвлення на CK20 та нейрон-специфічну енолазу та негативне забарвлення на тиреоїдний транскрипційний фактор-1 [306].

Стадіювання ККМ відбувається за останніми рекомендаціями the American Joint Committee on Cancer (2016 рік), особлива увага в новій класифікації приділяється додаванням метастатичних форм без первинної локалізації починаючи із III (клінічної), що поділяється на IIIA (патологоанатомічне підтвердження ураження тільки сторожового лімфатичного вузла) та IIIB (патологоанатомічне підтвердження метастазів в регіональних лімфатичних вузлах) та в IV стадії з наявністю віддалених метастазів поза межами регіональних. Треба зазначити, що із збільшенням стадії процесу показник загальної виживаності різко падає (40,3 % – IIIA, 26,8 – IIIB, 13,5 – IV). Прогресія в метастатичній ККМ є загальним та типовим протягом перших 3 років з виставлення діагнозу. Метастази найбільш часто виникають в басейні дренажних лімфатичних судів, а саме дистанційна шкіра, легені, центральна нервова система кістки, печінка [305].

Епідеміологія говорить про вірус-інтегровані та незалежні форми ККМ, а також ультрафіолет – залежні в невірусних ККМ, Патогенез незрозумілий до кінця, за умови, що клітини першоджерела не визначені. До 80 % позитивні на інтегровані віруси і залежні від експресії вірусного онкогену. Дослідження невірусних форм призвели до висновків поєднання накопичувальної

інсоляції у людей похилого віку (поєднання обох факторів ризику). Інші фактори ризику це різні умови імуносупресії, інші пухлини в анамнезі, трансплантація органів. У чоловіків частіше ніж у жінок, заданими канцер-реєстру України. За прогнозом трабекулярний тип більш благо сприятливий, а дрібноклітинний асоційований із більш агресивною поведінкою [304].

За даним останніх досліджень, карцинома з клітин Меркеля часто має делецію на короткому плечі хромосоми 1 (1p36) і є загальною для інших нейроендокринних пухлин, таких як меланома та нейробластома. Чисельні інші хромосомні поломки є описаними, наприклад трисомія за 6 хромосомою, приблизно до 50 % пухлин. Таким чином, деякі дослідники вважають, що ця пухлина походить з примітивних епідермальних стволових клітин, що можуть стати епідермісом або нейроендокринними клітинами [306]. За сукупністю факторів ризику, прогресія карциноми з клітин Меркеля включає більш похилий вік, локалізацію на голові та шії, розмір більше 2 см, імуносупресію та прогресію захворювання. Гістопатологічні та імуногістохімічні фактори ризику демонструють більше ніж 10 мітотичних фігур на великому збільшенні, дрібноклітинну гістологічну форму, ангіолімфатичну інвазію та імунореактивність на CD44 [307].

В епоху прецизійної медицини ІГХ відіграє вирішальну роль у класифікації пухлин за підтипами для своєчасного й точного прийняття терапевтичних рішень. Порівняно з іншими методами, ІГХ має ряд переваг, серед яких є широка доступність, технічна простота та економічна вигода за короткий термін часу. Крім того, ІГХ може бути інтерпретована з використанням меншої кількості пухлинних патернів, ніж потрібно для інших молекулярних методів. Більше того, ІГХ дозволяє оцінювати клітинну локалізацію та структури фарбування в контексті пухлинних структур, що надає більший діапазон інформації. Але використання секвенування генів для пошуку можливих терапевтичних цілей активно розвивається останні десятиріччя. Молекулярно-специфічні FISH аналізи мають величезний потенціал як практичні засоби скринінгу виявлення генетичних змін, що підлягають корекції лікарськими

препаратами, а також для оцінки маркерів молекулярно-цілеспрямованої терапії. В нашому дослідженні порівняно ефективність ІГХ та FISH методів для визначення делеції CDKN2A та ампліфікації HER-2/neu в спостереженнях сприятливих фенотипів синдрому «Рак невідомої первинної локалізації».

Канцерогенез різних епітеліальних пухлин починається з ушкодження короткого плеча 9 хромосоми. Локус INK4A / ARF (9p21) є відповідальним за два гени p16 / INK4A / CDKN2A і ген p19 / ARF (ARF - alternate reading frame – альтернативна рамка зчитування). p16^{INK4A} є геном-супресором пухлинного росту і входить в родину інгібіторів циклін-залежних кіназ або, так званих, "зберігачів клітинного циклу". Його спорадичні точкові мутації знаходять в спостереженнях сімейної меланоми, а гомозиготні делеції обумовлюють карциноми шийки матки, легенів, підшлункової залози, Т- і В-клітинні лейкози, гліоми, тощо. Цікаво, що в цьому ж локусі виявилась також альтернативна рамка зчитування - p19 / ARF. Другий ген кодує протеїн клітинного циклу, що перешкоджає руйнуванню білка p53.

Останні дослідження говорять, що активність p16^{INK4a} безпосередньо зв'язана з низкою онкогенів Rb / cyclin D / cdk 4 / p16^{INK4a}. А саме p16^{INK4a} поєднується з кіназами cdk-4/6, ця колаборація в свою чергу перешкоджає взаємодії кинази і цикліну D, наступна дезактивація кіназ викликає гіпофосфорілювання білку pRb, знижує рівень експресії E2F-залежних генів, і, як наслідок, призупиняється проходження по клітинному циклу з G1 в S. Поступова втрата експресії p16^{INK4A} викликає гіперфосфорілювання pRB. В такому стані pRB не може формувати комплекс з фактором транскрипції E2F. Далі зв'язок RB-E2F руйнується і вільний фактор E2F активує транскрипцію генів, відповідальних за початок S фази (активується проліферація).

ERBB2 (англ. Erb-b2 receptor tyrosine kinase 2) – білок, що кодується однойменним геном, у людей описаний на короткому плечі 17-ї хромосоми. ERBB скорочено походить від еритробластичного онкогену B, гена, здобутого з геному птахів. Його також часто називають HER2 (від рецептора епідермального фактора 2 людини) або HER-2/neu. Підвищення або надмірна екс-

пресія HER2 є мішенню терапії для приблизно 30 % пацієток з карциномою МЗ. Дослідження гістологічних зрізів пухлинного матеріалу, ІГХ та FISH, що можуть об'єктивно показати надмірну експресію цього білка та /або ампліфікацію гена, є методами першого вибору для верифікації статусу ERBB2 (HER2) для РНПЛ [308].

Порівняння методів ІГХ та FISH показало, що останній є більш точним для виявлення мутацій: ІГХ експресія p16^{INK4A} виявилась позитивною в 31 з 61 спостереження (51 %), коли FISH виявило 9 гомозиготних та 19 гетерозиготних делецій 9p21 28 з 61 (45,90 %); експресія HER-2/neu виявилась позитивною (2+/3+) в 15 з 61 (24,59 %) РНПЛ, але тільки в 9 з них мала дійсну ампліфікацію гена ERBB2 на FISH (14,75 %).

Порівняно невелика кількість фенотипів РНПЛ з ампліфікацією гену ERBB2 та делецією 9p21 (p16^{INK4A} / CDKN2A) спонукає на подальші дослідження молекулярних особливостей первинно дисемінованих форм карцином для пояснення агресивного перебігу пухлин без первинного джерела.

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-синьо-клітинних пухлин (30 - 45 мкм² 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 і/або HMB45] на розширену і адаптовану панель для дрібно-кругло-синьо-клітинних пухлин [Pan CK AE1/3, Desmin, CD45, CD56, CD99, S100 і/або HMB45]. 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 (+), CK 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 (-), CK 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, CK 7, CK 20, ER, WT-1, PAX-8, CDX-2, Calretinin, Chromogranin A і/або Synaptophysin].

3. Серозний папілярний канцероматоз у жінок з фенотипом [CA-125 (+), CK 7 (+), CK 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: CK 7 - строго (+), CK 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 (+), CK 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^{INK4A}]. Фокальна позитивна експресія p53, ядерна транлокація β -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 α FP та найменші ядра клітин.

8. Серед 62 осіб з анонімними метастазами карциноми в лімфатичні вузли шиї у 35 (56,45 %) хворих були визначені метастази плоскоклітинного раку з фенотипом [Pan CK AE1/3 (+), CK HMW (+), p63 (+), TTF-1 (-), p16^{INK4A} (+/-)], подібним до первинної плоскоклітинної карциноми голови і шиї. 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^{INK4A} 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^{INK4A}, 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^{INK4A} (+)/(-)], 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^{INK4A} позитивний статус і відношення до репродуктивної системи, що свідчить про доцільність використання p16^{INK4A} в діагностиці метастазів в пахові лімфатичні вузли.

10. За даними цифрової морфометрії метастатичні нейроендокринні карциноми (G3) без позитивних органоспецифічних маркерів мали достовір-

но 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^{INK4A} 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 зародково-клітинний 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^{INK4A} / CDKN2A), що зустрічається значно частіше (усі імунофенотипи крім екстрагонального зародково-клітинного синдрому), вірогідно як універсальна мутація дисемінованного 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. Тракткування сприятливих імунофенотипів 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 $28,9 \pm 8,09$, периметр $21,3 \pm 2,56$, коефіцієнт круглості $0,68 \pm 0,14$;
- для АК з ураженням ізольованих однобічних АЛВ у жінок відповідність фенотипу карциноми МЗ [СК 7 (+), СК 20 (-), PAX-8 (-) ER (+/-), PGR (+/-), HER-2/neu (+/-)], площа $41,1 \pm 9,67$, периметр $25,5 \pm 2,96$, коефіцієнт круглості $0,70 \pm 0,12$;
- для чоловіків з метастатичним ураженням кісток і підвищенням рівня серологічного маркера PSA відповідність фенотипу ацинарній АК ПЗ [СК 8 (+), PSA (+), AMACR (p504s) (+), AR (+/-)], площа $49,8 \pm 9,93$, периметр $27,6 \pm 2,97$, коефіцієнт круглості $0,77 \pm 0,11$;
- для АК колоректального профілю відповідність фенотипу колоректального раку [СК 20 (+), СК 7 (-), CDX-2 (+)], площа $38,9 \pm 12,31$, периметр $23,9 \pm 3,75$, коефіцієнт круглості $0,75 \pm 0,08$;
- для низькодиференційованої карциноми з розташуванням по середній лінії тіла (екстрагонадний зародково-клітинний синдром) відповідність ембріональній карциномі [CD30 (+), EMA (+), Pan CK AE1/3 (+)], площа $31,4 \pm 2,72$, периметр $25,2 \pm 2,35$, коефіцієнт круглості $0,75 \pm 0,12$;

- для метастазів ПР в ЛВШ відповідність фенотипу ПР голови та шиї [СК HMW (+), p63 (+), СК 7 (-), TTF-1 (-), p16^{INK4A} (+/-)], 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^{INK4A} (+)], 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^{INK4A} (+/-)], площа 62,3±8,38, периметр 30,6±3,71, коефіцієнт круглості 0,73±0,04;
- для НЕК (G3) відповідність фенотипу дрібноклітинної карциноми легень [Chromogranin A (+), Synaptophysin (+), СК 7 (+), TTF-1 (+), CD56 (+)], площа 25,3±4,99, периметр 18,9±1,89, коефіцієнт круглості 0,74±0,08;
- для метастазів КKM відповідність імунофенотипу [Pan СК AE1/3 (парануклеарно +), СК 20 (парануклеарно +), Chromogranin A (+/-), Synaptophysin (+/-)], площа 37,3±5,69, периметр 23,1±1,52, коефіцієнт круглості 0,79±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^{INK4A} (ядерно-цитоплазматична +) не завжди співпадають з наявністю дійсного генетичного ушкодження.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. How to Diagnose and Treat a Cancer of Unknown Primary Site. C. Tomuleasa, F. Zaharie, M.-S. Muresan, et al. *J Gastrointestin Liver Dis.* 2017. Vol. 26 (1). P. 69-79. DOI: <http://dx.doi.org/10.15403/jgld.2014.1121.261.haz>.
2. Comprehensive analysis of cancers of unknown primary for the biomarkers of response to immune checkpoint blockade therapy. Z. Gatalica, J. Xiu, J. Swensen, S. Vranic. *European J of Cancer.* 2018. Vol. 94 (1). P. 179-186. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.ejca.2018.02.021>.
3. Greco F. A. Cancer of Unknown Primary Site: Improved Patient Management with Molecular and Immunohistochemical Diagnosis. *ASCO EDUCATIONAL BOOK.* 2013. P. 175-181.
4. Comprehensive Genomic Profiling of Carcinoma of Unknown Primary Site New Routes to Targeted Therapies. J. S. Ross, K. Wang, L. Gay et al. *JAMA Oncol.* 2015. Vol. 1 (1). P. 40-49. doi:10.1001/jamaoncol.2014.216.
5. Molecular driver alterations and their clinical relevance in cancer of unknown primary site. H. Löffler, N. Pfarr, M. Kriegsmann et al. *Oncotarget.* 2016. Vol. 7 (28). P. 44322-44329.
6. Mills S. E., Carter D., Greenson J. K. Diagnostic surgical pathology. *Wolters Kluwer.* 2010; Vol. 2. P. 2278-2308.
7. Hanahan D, Weinberg R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011. Vol. 144. P. 646-674.
8. Next generation sequencing of carcinoma of unknown primary reveals novel combinatorial strategies in a heterogeneous mutational landscape. I. M. Subbiah, A. Tsimberidou, V. Subbiah et al. *Oncoscience.* 2017. Vol. 4 (5-6). P. 47-56.
9. Extent of diagnostic inquiry among a population-based cohort of patients with cancer of unknown primary. J. Smith-Gagen, C. M. Drake, L. L. White,

- P. S. Pinheiro. *Cancer Rep Rev.* 2019. Vol. 3. P. 1-8. doi: 10.15761/CRR.1000187.
10. Vajdic C. M., Goldstein D. Cancer of unknown primary site. *Aust Fam Physician.* 2015. Vol. 44 (9). P. 640-643.
 11. Оцінка простеженості контингентів хворих зі злоякісним новоутвореннями жіночих репродуктивних органів в Україні. З. П. Федоренко, Л. О. Гулак, А. Ю. Рижов та ін. *Клиническая онкология.* 2017. Т. 26, № 2. С. 31-35.
 12. p16 overexpression and 9p21 deletion are linked to unfavorable tumor phenotype in breast cancer. P. Lebok, M. Roming, M. Kluth et al. *Oncotarget.* 2016. Vol. 7 (49). P. 81322-81331.
 13. Комаров И. Г., Слетина С. Ю. Метастазы злокачественных опухолей без выявленного первичного очага. *Онкогинекология.* 2015. Т. 2. С. 50-58.
 14. Genetic status of cell cycle regulators in squamous cell carcinoma of the oesophagus: the CDKN2A (p16INK4a and p14ARF) and p53 genes are major targets for inactivation. J. Smeds, P. Berggren, X. Ma et al. *Carcinogenesis.* 2002. Vol. 23 (4). P.645-655.
 15. Пилипенко М. І., Лісовий В. М. Медицина, заснована на сумлінні: сучасні підходи до ведення хворих на рак передміхурової залози. *Клиническая онкология.* 2018. Т. 8, № 3. С. 1-7.
 16. Significance of HER2 protein expression and HER2 gene amplification in colorectal adenocarcinomas. Xin-Yu Wang, Zhi-Xue Zheng, Yu Sun et al. *World J Gastrointest Oncol.* 2019. Vol. 11 (4). P. 335-347. DOI: 10.4251/wjgo.v11.i4.335.
 17. 32nd Annual Meeting and Pre-Conference Programs of the Society for Immunotherapy of Cancer (SITC 2017): Part One. National Harbor. *Journal for Immuno Therapy of Cancer.* 2017. Vol. 5 (2). P. 86. DOI <https://doi.org/10.1186/s40425-017-0289-3>.

18. 32nd Annual Meeting and Pre-Conference Programs of the Society for Immunotherapy of Cancer (SITC 2017): Part Two. National Harbor. *Journal for Immuno Therapy of Cancer*. 2017. Vol. 5 (2). P. 87. DOI <https://doi.org/10.1186/s40425-017-0288-4/>
19. Трякин А. А., Федянин М. Ю., Покатаев И. А. 20 лет таргетной терапии солидных опухолей. Успехи и неудачи. *Практическая онкология*. 2018. Т. 19, № 3. С. 183-199. DOI 10.31917/1903183.
20. Greco F. A. Molecular diagnosis of the tissue of origin in cancer of unknown primary site: useful in patient management. *Curr Treat Options Oncol*. 2013. Vol. 14 (4). P. 634-642.
21. Bahrami A., Truong L. D., Ro J. Y. Undifferentiated tumor, true identity by immunohistochemistry. *Arch Pathol Lab Med*. 2008. Vol. 132. P. 326-348.
22. Fletcher C.D.M., author. Diagnostic histopathology of tumors. 4th ed. PA: Elsevier. 2013. 1148 p.
23. Lin F., Liu H. Immunohistochemistry in undifferentiated neoplasm / tumor of uncertain origin. *Arch Pathol Lab Med*. 2014. Vol. 138. P. 1583-1610. doi: 10.5858/arpa.2014-0061-RA.
24. International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th Revision. World Health Organization. Geneva, 1992. Vol. 1. 698 p.
25. Иммуногистохимия в диагностике опухолей. М.С.А. Туффаха, С. Гичка, Г. Гуски, Г. Кристиансен. К.: Книга-плюс. 2018. 336с.
26. Kaspar H. G., Crum C. P. The Utility of immunohistochemistry in the differential diagnosis of gynecologic disorders. *Arch Pathol Lab Med*. 2015. Vol. 139. P. 39-54. doi: 10.5858/arpa.2014-0057-RA.
27. Nesina I. P., Iurchenko N. P., Buchynska L. G. Markers of the epithelial-mesenchymal transition in cells of endometrial carcinoma. *Experimental Oncology*. 2018. Vol. 40. P. 218-222.

28. Lin F., Chen Z. E., Wang H. L. Utility of Immunohistochemistry in the Pancreatobiliary Tract. *Arch Pathol Lab Med.* 2015. Vol. 139. P. 24-38; doi: 10.5858/arpa.2014-0072-RA.
29. A Long survival of a patient with brain metastasis of unknown site of the primary tumor. W. Ben Kridis, S. Sghaier, N. Toumi et al. *Experimental Oncology.* 2018. Vol. 40. P. 85-87.
30. Round Cell Tumors: Classification and Immunohistochemistry. S. Sharma, R. Kamala, D. Nair et al. *Indian J Med Paediatr Oncol.* 2017. Vol. 38 (3). P. 349-353. doi: 10.4103/ijmpo.ijmpo_84_16.
31. World Health Organisation Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone, 4th ed. C. D. M. Fletcher, J. A. Bridge, P. C. W. Hogendoorn, F. Mertens (Eds.). IARC Press: Lyon, France, 2013. 468 p.
32. Rekhi B, Mridha A, Kattoor J. Small round cell lesions of the bone: Diagnostic approach, differential diagnoses and impact on treatment. *Indian J Pathol Microbiol.* 2019. Vol. 62. P.199-205.
33. Joshi M. R., Jetly D., Kundariya M. The Malignant Round Cell Tumors: Histopathological Study and Immunohistochemistry. *International Journal of Current Research and Review.* 2019. Vol. 11 (08). P. 1-7. DOI: <http://dx.doi.org/10.31782/IJCRR.2019.0107>.
34. Thompson L. D. R. Small round blue cell tumors of the sinonasal tract: a differential diagnosis approach. *Modern Pathology.* 2017. Vol. 30. P. S1-S26.
35. Саркоми м'яких тканин: етіологія, епідеміологія класифікація. С.І. Коровін, В.В. Остафійчук, А.Ю. Палівець та ін. *Клінічна онкологія.* 2016. Т. 3 (23). С. 25-28.
36. Саркоми м'яких тканин: діагностика та лікування. В.В. Остафійчук, С.І. Коровін, А.Ю. Палівець та ін. *Клінічна онкологія.* 2017. Т. 1 (23). С. 21-25.

37. Myxoid liposarcoma: local relapse and metastatic pattern in 43 patients. H. R. Dürr, J. Rauh, A. Baur-Melnyk et al. *BMC Cancer*. 2018. Vol. 18. P. 304. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4226-8>.
38. Liposarcoma: Advances in Cellular and Molecular Genetics Alterations and Corresponding Clinical Treatment. Lingge Yang, Shiqi Chen, Peng Luo et al. *Journal of Cancer*. 2020. Vol. 11 (1). P. 100-107. doi: 10.7150/jca.36380.
39. Establishment and characterization of a new human myxoid liposarcoma cell line (DL-221) with the FUS-DDIT3 translocation. M. A. de Graaff, J. S. E. Yu, H. C. Beird et al. *Laboratory Investigation*. 2016. Vol. 96. P. 885-894.
40. Desmoplastic Small Round Blue Cell Tumor: A Review of Treatment and Potential Therapeutic Genomic Alterations. A. Bulbul, B. N. Fahy, J. Xiu et al. *Hindawi Sarcoma*. 2017. Vol. 2017, P. 1-12. DOI: <https://doi.org/10.1155/2017/1278268>.
41. Desmoplastic Small Round Cell Tumour Successfully Treated with Caffeine-assisted Chemotherapy: A Case Report and Review of the Literature. S. Miwa, S. Kitamura, T. Shirai et al. *Anticancer Research*. 2010. Vol. 30. P. 3769-3774.
42. A case of long-term survival of metastatic desmoplastic small round cell tumor treated with multimodal therapy. T. Watanabe, S. Miyamoto, K. Kitagori et al. *Oncology Letters*. 2011. Vol. 3. P. 30-34. DOI: <https://doi.org/10.3892/ol.2011.457>.
43. Sinonasal desmoplastic small round cell tumor: a case report and review of the literature. Y. Tao, L. Shi, L. Ge et al. *BMC Cancer*. 2019. Vol. 19. P. 868. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12885-019-6076-4>.
44. Parham D. M., Barr F. G. Classification of Rhabdomyosarcoma and Its Molecular Basis. *Adv Anat Pathol*. 2013. Vol. 20 (6). P. 387-397. doi:10.1097/PAP.0b013e3182a92d0d.
45. Epidemiology, Incidence, and Survival of Rhabdomyosarcoma Subtypes: SEER and ICES Database Analysis. K. M. Amer, J. E. Thomson, D. Congiusta et al. *J Orthop Res*. 2019. Vol. 37. P. 2226.

46. Histology, Fusion Status, and Outcome in Alveolar Rhabdomyosarcoma With Low-Risk Clinical Features: A Report From the Children's Oncology Group. M. A. Arnold, J. R. Anderson, J. M. Gastier-Foster et al. *Pediatric Blood & Cancer*. 2016. Vol. 63 (4). P:634-639. DOI: 10.1002/pbc.25862.
47. Colon N. C., Chung D. H. Neuroblastoma. *Adv Pediatr*. 2011. Vol. 58 (1). P. 297-311. doi:10.1016/j.yapd.2011.03.011.
48. Ikegaki N., Shimada H. Subgrouping of Unfavorable Histology Neuroblastomas With Immunohistochemistry Toward Precision Prognosis and Therapy Stratification. *JCO Precision Oncology*. 2019. Vol. 2019. P. 1-10. DOI: 10.1200/PO.18.00312.
49. Recommendations for the Standardization of Bone Marrow Disease Assessment and Reporting in Children With Neuroblastoma on Behalf of the International Neuroblastoma Response Criteria Bone Marrow Working Group. S. A. Burchill, K. Beiske, H. Shimada et al. *Cancer*. 2017. Vol. 123. P. 1095-1105. DOI: 10.1002/cncr.30380.
50. Diagnostic value of TLE1 for synovial sarcoma: immunohistochemical analyses of genetically confirmed synovial sarcomas and nonsynovial sarcomas. Xin He, Bo Xiong, Tingqing Zhou et al. *Int J Clin Exp Pathol*. 2016. Vol. 9 (4). P.4339-4350.
51. Diagnostic Value of TLE1 in Synovial Sarcoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. M. El Beaino, D. C. Jupiter, T. Assi et al. *Hindawi Sarcoma*. 2020. Vol. 2020. P. 1-6. doi.org/10.1155/2020/7192347.
52. Первичная синовиальная саркома перикарда. О.В. Пикин, Н.Н. Волченко, В.В. Бармин, [та др.]. *Онкология. Журнал им. П.А. Герцина*. 2018. Т. 7 (1). С. 43-45. DOI: 10.17116/onkolog20187141-45.
53. Anderson T. E., Conran R. M. Educational Case: Wilms Tumor (Nephroblastoma). *Academic Pathology*. 2019. Vol. 6. P.1-4. DOI: 10.1177/2374289518821381
54. Vujani G. M., Sandstedt B. The pathology of Wilms' tumour (nephroblastoma): the International Society of Paediatric Oncology ap-

- proach. *J Clin Pathol.* 2010. Vol. 63. P. 102e-109. doi:10.1136/jcp.2009.064600.
55. Lenon M. S. L., Lopez R. A., Lusaya D. G. Adult Nephroblastoma (Wilms Tumor): A Case Report. *Med Surg Urol.* 2015. Vol. 4 (2). P. 1-3. doi:10.4172/2168-9857.1000150.
56. Mesenchymal chondrosarcomas showing immunohistochemical evidence of rhabdomyoblastic differentiation: a potential diagnostic pitfall. A. L. Folp, R. P. Graham, A. Martinez et al. *Human Pathology.* 2018. Vol. 77. P. 28-34. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2018.03.012>.
57. Extraskeletal mesenchymal chondrosarcoma at unusual location involving spleen and kidney with review of literature. K. C. Pani, M. Yadav, P. V. Priyaa, N. Kumari. 2017. Vol. 60 (2). P. 262-264.
58. Arora K., Riddle N. D. Extraskeletal Mesenchymal Chondrosarcoma. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine.* 2018. Vol. 142 (11). P. 1421-1424. <https://doi.org/10.5858/arpa.2017-0109-RS>.
59. Biomarkers of Osteosarcoma, Chondrosarcoma, and Ewing Sarcoma. F. R. Evola, L. Costarella, V. Pavone et al. *Front. Pharmacol.* 2017. Vol. 8 (150). P. 1-8. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00150>.
60. The Role of Immunohistochemistry in the Analysis of the Spectrum of Small Round Cell Tumours at a Tertiary Care Centre. L. D'Cruze, R. Dutta, S. Rao et al. *Journal of Clinical and Diagnostic Research.* 2013. Vol. 7 (7). P. 1377-1382. DOI: 10.7860/JCDR/2013/5127.3132.
61. Small Cell Osteosarcoma: Clinicopathologic, Immunohistochemical, and Molecular Analysis of 36 Cases. A. Righi, M. Gambarotti, S. Longo et al. *The American Journal of Surgical Pathology.* 2015. Vol. 39 (5). P. 691-699. DOI: 10.1097/PAS.0000000000000412.
62. CD99 Expression in Glioblastoma Molecular Subtypes and Role in Migration and Invasion. L. C. Cardoso, R. D. S. Soares, T. S. Laurentino et al. *Int J Mol Sci.* 2019. Vol. 20 (5) P. E1137. doi: 10.3390/ijms20051137.

63. CD99 expression is strongly associated with clinical outcome in children with B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. D. Chen, A. Camponeschi, Q. Wu et al. *Br J Haematol*. 2019. Vol. 184 (3). P. 418-423. doi: 10.1111/bjh.15683.
64. Bresnick A. R., Weber D. J., Zimmer D. B. S100 proteins in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2015. Vol. 15 (2). P. 96-109. doi: 10.1038/nrc3893.
65. Marenholz I., Heizmann C. W., Fritz G. S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2004. Vol. 322 (4). P. 1111-1122. doi:10.1016/j.bbrc.2004.07.096.
66. Proteomic study of thyroid tumors reveals frequent up-regulation of the Ca²⁺ -binding protein S100A6 in papillary thyroid carcinoma. A. Sofiadis, A. Dinets, L. M. Orre et al. *Thyroid*. 2010. 20 (10). P. 1067-1076. doi:10.1089/thy.2009.0400
67. Soft Tissue Tumor Immunohistochemistry Update Illustrative Examples of Diagnostic Pearls to Avoid Pitfalls. S. Wei, E. Henderson-Jackson, X. Qian, M. M. Bui. *Arch Pathol Lab Med*. 2017. Vol. 141. P. 1072-1091; doi: 10.5858/arpa.2016-0417-RA).
68. Spindle cell lesions: A review on immunohistochemical markers. Surbhi, R. Metgud, S. Naik, S. Patel. *J Can Res Ther*. 2017. Vol. 13. P. 412-418. DOI: 10.4103/0973-1482.176178.
69. Hirota S. Differential diagnosis of gastrointestinal stromal tumor by histopathology and immunohistochemistry. *Transl Gastroenterol Hepatol*. 2018. Vol. 3. P. 27. doi: 10.21037/tgh.2018.04.01.
70. Neuroblastoma between 1990 and 2014 in the Netherlands: Increased incidence and improved survival of high-risk neuroblastoma. M. L. Tas, A. M. J. Reedijka, H. E. Karim-Kosb et al. *European Journal of Cancer*. Vol. 124. P. 47-55.

71. Patient-derived organoids (PDOs) as a novel in vitro model for neuroblastoma tumours. P. Fusco, B. Parisatto, E. Rampazzo et al. *BMC Cancer*. 2019. Vol. 19. P. 970. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-6149-4>.
72. Morphometric evaluation of NB84, synaptophysin and AgNOR is useful for the histological diagnosis and prognosis in peripheral neuroblastic tumors (pNTs). A. C. Carvalho, E. R. Parra, M. C. Zerbini et al. *Clinics*. 2007. Vol. 62 (6). P. 731-740.
73. Wilms' tumor 1 (WT-1) expression and prognosis in solid cancer patients: a systematic review and meta-analysis. X. Qi, F. Zhang, H. Wu et al. *Sci Rep*. 2015. Vol. 5. P. 8924. doi: 10.1038/srep08924.
74. Wilms' tumor 1 (WT-1) as a prognosis factor in gynecological cancers A meta-analysis. L. Jingjing; G. Yang; L. Qing et al. *Medicine*. 2018. Vol. 97 (28). P. e11485. doi: 10.1097/MD.00000000000011485.
75. WT-1 expression in vessels varies with histopathological grade in tumour-bearing and control tissue from patients with breast cancer. R. J. McGregor, Y. Chau, T. J. Kendall et al. *British Journal of Cancer*. 2018. Vol. 119. P. 1508-1517.
76. Diagnostic Value of Neuron-Specific Enolase (NSE) and Cancer Antigen 15-3 (CA 15-3) in the Diagnosis of Pleural Effusions. M. A. Saba, T. Valeh, H. Ehteram et al. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2017. Vol. 18 (1). P. 257-261. doi: 10.22034/APJCP.2017.18.1.257.
77. Is neuron-specific enolase useful for diagnosing malignant pleural effusions? Evidence from a validation study and meta-analysis. Jing Zhu, Mei Feng, Liqun Liang et al. *BMC Cancer*. 2017. Vol. 17. P. 590. DOI 10.1186/s12885-017-3572-2.
78. Chromogranin A and neuron-specific enolase in neuroblastoma: Correlation to stage and prognostic factors. K. Georgantzi, E. G. Sköldenberg, M. Stridsberg et al. *Pediatric Hematology and Oncology*. 2018. Vol. 35 (2). P. 156-165. DOI: 10.1080/08880018.2018.1464087.

79. Alpha-Smooth Muscle Actin (α -SMA). Shen Cherng, Jenny Young, Hongbao Ma. *The Journal of American Science*. 2008. Vol. 4 (4). P.7-9.
80. Dabbs D. J., author. Diagnostic immunohistochemistry: theranostic and genomic applications. 3rd ed. Pittsburgh: Saunders. 2010. 960 p.
81. Histochemical and Immunohistochemical Study of α -SMA, Collagen, and PCNA in Epithelial Ovarian Neoplasm. N. Anggorowati, C. R. Kurniasari, K. Damayanti et al. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2017. Vol. 18 (3). P. 667-671. doi: 10.22034/APJCP.2017.18.3.667.
82. Duan K., Mete O. Algorithmic Approach to Neuroendocrine Tumors in Targeted Biopsies: Practical Applications of Immunohistochemical Markers. *Cancer Cytopathol*. 2016. Vol. 124. P. 871-84. DOI: 10.1002/cncy.21765.
83. Neuroendocrine Markers Insulinoma-Associated Protein 1, Chromogranin, Synaptophysin, and CD56 Show Rare Positivity in Adenocarcinoma Ex-Goblet Cell Carcinoids. C. Yanga, I. Gonzalezb, L. Zhangc, D. Cao. *Gastroenterol Res*. 2019. Vol. 12 (3). P. 120-127.
84. Synaptophysin-Ki67 double stain: a novel technique that improves interobserver agreement in the grading of well-differentiated gastrointestinal neuroendocrine tumors. K. Matsukuma, K. A. Olson, D. Gui et al. *Modern Pathology*. 2017. Vol. 30. P. 620-629. doi:10.1038/modpathol.2016.225.
85. Distribution of Neuroendocrine Marker-Positive Cells in Colorectal Cancer Tissue and Normal Mucosal Tissue: Consideration of Histogenesis of Neuroendocrine Cancer. T. Ogimia, S. Sadahiroa, Y. Kameia et al. *Oncology*. 2019. Vol. 97. P. 294-300.
86. Al-Risi E. S., Al-Essry F. S., Mula-Abed W.-A. S. Chromogranin A as a Biochemical Marker for Neuroendocrine Tumors: A Single Center Experience at Royal Hospital, Oman. *Oman Med J*. 2017. Vol. 32 (5). P. 365-370. doi: 10.5001/omj.2017.71.
87. Chromogranin A – unspecific neuroendocrine marker. Clinical utility and potential diagnostic pitfalls. P.ł Gut, A. Czarnywojtek, J. Fischbach et al. *Arch Med Sci*. 2016. Vol. 12 (1). P. 1–9. doi: 10.5114/aoms.2016.57577

88. Rapid Progression of Intracranial Dural Metastases in a Patient with Carcinoma of Unknown Primary Site. H. Takedaa, R. Oheb, T. Fukuia et al. *Case Rep Oncol.* 2019. Vol. 12. P. 666-670.
89. Carollo A., Rosenkranz T., Smith D. J. Cancer of unknown primary (CUP) presenting as a Spigelian hernia: a case report. *J Surg Case Rep.* 2017. Vol. 2017 (4). P. rjw218. doi: 10.1093/jscr/rjw218.
90. Carcinoma of Unknown Primary Site: Outcomes in Patients with a Colorectal Molecular Profile Treated with Site Specific Chemotherapy. F. A. Greco, W. J. Lennington, D. R. Spigel et al. *Journal of Cancer Therapy.* 2012. Vol. 3. P. 37-43.
91. Bochtler T., Krämer A. Does Cancer of Unknown Primary (CUP) Truly Exist as a Distinct Cancer Entity? *Front. Oncol.* 2019. Vol. 9. P. 402. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00402>.
92. Зелінська Г. В. Можливості цитологічної діагностики в передопераційному прогнозуванні поведінки пухлини та виборі адекватної терапії. *Ендокринологія.* 2018. Т. 23, № 1 С. 47-52. (724).
93. Cancers of unknown primary origin (CUP) are characterized by chromosomal instability (CIN) compared to metastasis of know origin. J. Vikeså, A. K. H Møller, B. Kaczkowski et al. *BMC Cancer.* 2015. Vol. 15. P. 151. DOI 10.1186/s12885-015-1128-x.
94. Циторедуктивна хірургія та HIPEC (hyperthermic intraperitoneal chemotherapy) в комбінованому лікуванні при раку яєчника. Р. Р. Ярема, Т. Г. Фецич, Н. А. Володько та ін. *Клиническая онкология.* 2017. № 4 (28) С. 26-32.
95. Особливості прогресії раку грудної залози після лікування Ю. Я. Чупровська, О. І. Іващук, В. Ю. Бодяка, Ю. Г. Церковний. *Клиническая онкология.* 2019. Т. 9, № 1 (33) С. 46-49.
96. Мартинчик А.В., Крячок І.А. Огляд 15-го Міжнародного конгресу, присвяченого діагностиці та лікуванню лімфом (ISML), Лугано, Швей-

- царія, 18–22 червня 2019 р. *Клінічна онкологія*. 2019. Т. 9. № 3 (35). С. 1-5. DOI: 10.32471/clinicaloncology.2663-466X.40.22889.
97. Kamposioras K, Pentheroudakis G, Pavlidis N. Exploring the biology of cancer of unknown primary: Breakthroughs and drawbacks. *Eur J Clin Invest*. 2013. Vol. 43. P. 491-500.
 98. Why human extragonadal germ cell tumours occur in the midline of the body: old concepts, new perspectives. J. W. Oosterhuis, H. Stoop, F. Honecker, L. H. Looijenga. *Int J Androl*. 2007. Vol. 30 (4). P. 256-263.
 99. Gao Y., Jiang J., Liu Q. Extragonadal malignant germ cell tumors: a clinicopathological and immunohistochemical analysis of 48 cases at a single Chinese institution. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015. Vol. 8 (5). P. 5650-5657.
 100. Chromosomes and expression in human testicular germ-cell tumors: insight into their cell of origin and pathogenesis. L. H. Looijenga, A. J. Gillis, H. J. Stoop et al. *Acad Sci*. 2007. Vol. 1120. P. 187-214.
 101. Looijenga L. H. Human testicular (non)seminomatous germ cell tumours: the clinical implications of recent pathobiological insights. *J Pathol*. 2009. Vol. 218 (2). P.146-162.
 102. Expression and interdependencies of pluripotency factors LIN28, OCT3/4, NANOG and SOX2 in human testicular germ cells and tumours of the testis. A. J. Gillis, H. Stoop, K. Biermann et al. *Int J Androl*. 2011. Vol. 34 (4 Pt 2). P. e160-174.
 103. Young R. H. Testicular tumors - some new and a few perennial problems. *Arch Pathol Lab Med*. 2008. Vol. 132 (4). P. 548-564.
 104. Peritoneal carcinomatosis. F. Coccolini, F. Gheza, M. Lotti et al. *World J Gastroenterol*. 2013. Vol. 19 (41). P. 6979-6994.
 105. Сучасні стратегії хірургічного лікування хворих на рак яєчника з тазовим канцероматозом. О. І. Ткаченко, А. І. Рибін, О. В. Кузнецова, В. Є. Максимовський. *Клиническая онкология*. 2018. Т. 8, № 3 (31) С. 1-4.

106. Fallopian Tube Lesions in Women at High Risk for Ovarian Cancer: A Multicenter Study. K. Visvanathan, P. Shaw, B. J. May et al. *Cancer Prev Res.* 2018. Vol. 11 (11). P. 697-706. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-18-0009.
107. High-grade serous ovarian cancer arises from fallopian tube in a mouse model. J. Kim, D. M. Coffey, C. J. Creighton et al. *PNAS.* 2012. Vol. 109 (10). P. 3921-3926. doi:10.1073/pnas.1117135109/-/DCSupplemental.
108. Активность белка p53 у больных раком яичника в зависимости от чувствительности к препаратам платины. В. Г. Дубинина, А. И. Рыбин, О. В. Кузнецова, О. М. Морозюк. *Клиническая онкология.* 2015. № 4 (20) С. 91-94.
109. Hirst J., Crow J., Godwin A. Ovarian Cancer Genetics: Subtypes and Risk Factors. *Ovarian Cancer - From Pathogenesis to Treatment.* 2018. P. 3-38. doi: 10.5772/intechopen.72705.
110. Tubal Origin of (Ovarian) Low-Grade Serous Carcinoma: A Gene Expression Profile Study. Y. Wang, S. Hong, J. Mu et al. *Journal of Oncology.* 2019. Vol. 2019. P. 1-9. doi:10.1155/2019/8659754.
111. A Comprehensive Review of Ovarian Serous Carcinoma. Y. Hatano, K. Hatano, M. Tamada et al. *Adv Anat Pathol.* 2019. Vol. 26. P. 329-339.
112. Cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. J. S. Berek, S. T. Kehoe, L. Kumar, M. Friedlander. *Int J Gynecol Obstet.* 2018. Vol. 143 (2). P. 59-78.
113. Prat J. Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *International Journal of Gynecology and Obstetrics.* 2014. Vol. 124. P. 1-5. doi: 10.1016/j.ijgo.2013.10.001.
114. The Role of the Fallopian Tube in Ovarian Cancer. A. A. Tone, S. Salvador, S. J. Finlayson et al. *Clinical Advances in Hematology & Oncology.* 2012. Vol. 10 (5). P. 296-306.

115. High-Grade Serous Ovarian Cancer: Basic Sciences, Clinical and Therapeutic Standpoints. M.-A. Lisio, L. Fu, A. Goyeneche et al. *Int. J. Mol. Sci.* 2019. Vol. 20 (952). P. 1-33. doi:10.3390/ijms20040952.
116. Gershenson D. M. Low-grade serous carcinoma of the ovary or peritoneum. *Annals of Oncology.* 2016. Vol. 27 (1). P. i45-i49.
117. A survival analysis comparing women with ovarian low-grade serous carcinoma to those with high-grade histology. M. Chen, Y. Jin, Y. Bi et al. *OncoTargets and Therapy.* 2014. Vol. 7. P. 1891-1899.
118. Cytologic studies of the fallopian tube in patients undergoing salpingo-oophorectomy. H. Chen, R. Klein, S. Arnold et al. *Cancer Cell Int.* 2016. Vol. 16 (78). P. 1-8. doi: 10.1186/s12935-016-0354-x.
119. Current strategies for the targeted treatment of high-grade serous epithelial ovarian cancer and relevance of BRCA mutational status. A. Gadducci, V. Guarneri, F.A. Peccatori et al. *Journal of Ovarian Research.* 2019. Vol. 12 (9). P. 1-9.
120. Proteome profiling of low grade serous ovarian cancer. H. B. Zadeh Fakhar, H. Zali, M. Rezaie-Tavirani et al. *Journal of Ovarian Research.* 2019. Vol. 12 (64). P. 1-14. doi: 10.1186/s13048-019-0535-z.
121. High grade serous ovarian carcinomas originate in the fallopian tube. S. I. Labidi-Galy, E. Papp, D. Hallberg et al. *Nature communications.* 2017. Vol. 8 (1093). P. 1-11. doi: 10.1038/s41467-017-00962-1.
122. Görkem S. B., O'Connell A. M. Abnormal axillary lymph nodes on negative mammograms: causes other than breast cancer. *Diagn Interv Radiol.* 2012. Vol. 18 (5). P. 473-479. doi: 10.4261/1305-3825.DIR.5491-11.2.
123. Іващук О. І., Бодяка В. Ю., Чупровська Ю. Я. Сучасні можливості щодо прогнозу метастатичного поширення раку грудної залози (огляд літератури). *Клиническая онкология.* 2018. Т. 8, № 3 (31) С. 1-3.
124. Pentheroudakis G., Lazaridis G., Pavlidis N. Axillary nodal metastases from carcinoma of unknown primary (CUPAx): a systematic review of published evidence. *Breast Cancer Res Treat.* 2010. Vol. 119. P. 1–11.

125. Breast Cancer as Isolated Axillary Lymphadenopathy. U. Okani, J. Dreading-Pulliam, Z. Shams et al. *The Internet Journal of Advanced Nursing Practice*. 2012. Vol. 11 (2). P. 1-11.
126. The effect of EUSOMA certification on quality of breast cancer care. P.A. van Dam, M. Tomatis, L. Marotti et al. Full length article. 2015. Vol. 41 (10). P. 1423-1429. doi: 10.1016/j.ejso.2015.06.006.
127. Епідеміологічні та організаційні передумови впровадження скринінгу раку грудної залози в Україні. З. П. Федоренко, Ю. Й. Михайлович, Л. О. Гулак та ін. *Клиническая онкология*. 2018. Т. 8, № 3 (31) С. 1-6.
128. Criteria for prediction of metastatic axillary lymph nodes in early-stage breast cancer. H. R. de Oliveira Filho, M. T. Dória, J. R. Morales Piato et al. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2015. Vol. 37 (7). P. 308-313.
129. Можливість застосування детекції сторожових лімфатичних вузлів у хворих на рак грудної залози після неoad'ювантної поліхіміотерапії. І. І. Смоланка, О. І. Костриба, В. О. Черниш та ін. *Клиническая онкология*. 2019. Т. 9, № 2 (34) С. 1-3. (737)
130. World Health Organization of tumours: pathology and genetics of head and neck tumours (4th edition). A. K. El-Naggar, J. K. C. Chan, J. R. Grandis et al. Lyon, France: IARC Press; 2017. 347 p.
131. Head and Neck Cancers, Version 1.2018 Featured Updates to the NCCN Guidelines. A. D. Colevas, S. S. Yom, D. G. Pfister et al. *J Natl Compr Canc Netw*. 2018. Vol. 16 (5). P. 479-490. doi: 10.6004/jnccn.2018.0026.
132. Пославська О. В. Особливості експресії онкопротеїну p16INK4a в плоскоклітинних раках орофарингеальної ділянки. *Медичні перспективи*. 2016. Т. 21 (2). С.69-73. <https://doi.org/10.26641/2307-0404.2016.2.72154>.
133. Comprehensive meta-analytical summary on human papillomavirus association with head and neck cancer. V. A. Bychkov, E. G. Nikitina, M. K. Ibragimova et al. *Exp Oncol*. 2016. Vol. 38 (2). P. 68-72.

134. An Infiltrative Squamous cell carcinoma of the sinonasal tract -A report of a rare case. Subhalakshmi, M. Mathew, A. R. Raghu et al. *International Journal of Advanced Research*. 2014. Vol. 2 (5). P. 792-798.
135. Ishida M., Okabe H. Basaloid squamous cell carcinoma of the maxillary sinus: Report of two cases in association with cathepsin K expression. *Oncol Lett*. 2013. Vol. 5 (6). P. 1755-1759.
136. Коробко Є. В., Процик В. С. Використання індукційної хіміотерапії в комплексному лікуванні хворих на рак ротової порожнини з урахуванням імуногістохімічних факторів. *Клиническая онкология*. 2015. № 4 (20) С. 33-38.
137. Sinonasal carcinoma: clinical, pathological, genetic and therapeutic advances. J. L. Llorente, F. López, C. Suárez, M. A. Hermsen. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2014. Vol. 11. P. 460-472. doi: 10.1038/nrclinonc.2014.97.
138. Розширена радикальна шийна дисекція в комбінованому лікуванні регіонарних метастазів у хворих зі злоякісними пухлинами голови та шиї. В. С. Процик, О. В. Кравець, О. М. Трембач, Є. В. Коробко. *Клиническая онкология*. 2013. № 3 (11) С. 84-86.
139. Cyclin D1 and Cancer Development in Laryngeal Premalignancy Patients. V. Papadimitrakopoulou, J. G. Izzo, D. D. Liu et al. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2009. Vol. 2 (1). P. 14-21.
140. Clinico-prognostic value of D-type cyclins and p27 in laryngeal cancer patients: a review. L. Pignataro, G. Sambataro, D. Pagani, G. Pruneri. *ACTA Otorhinolaryngol ital*. 2005. Vol. 25. P. 75-85.
141. Studies of the cell cycle regulatory proteins p16, cyclin D1 and retinoblastoma protein in laryngeal carcinoma tissue. T. Krecicki, R. Smigiel, M. Fraczek et al. *The Journal of Laryngology & Otology*. 2004. Vol. 118 (9). P. 676-680.
142. Expression of cyclin D1, p27, p21, bcl-2, and p53 in laryngeal squamous cell carcinoma and an investigation of the correlation with conventional

- prognostic factors. G. Şimsek, Ü. Han, B. Önal et al. *Turkish Journal of Medical Sciences*. 2013. Vol. 43. P. 27-32. doi:10.3906/sag-1202-104.
143. Expression of p27 protein and cyclinD1 in laryngeal carcinoma. L. Zhang, Y. Xu, Y. Ge et al. *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi*. 2002. Vol. 16 (12). P. 646-674.
144. Clinical implication of p53 alterations in oral cancer progression: a review from India. K. R. Patel, B. N. Vajaria, R. D. Singh et al. *Exp Oncol*. 2018. Vol. 40 (1). P. 10-18.
145. An immunohistochemical study of cyclin D1 protein expression in laryngeal squamous cell carcinoma. K. Morshed, D. Skomra, E. Korobowicz et al. *Acta Oto-laryngologica*. 2007. Vol. 127 (7). P. 760-769.
146. World Health Organization Classification of Tumours of Female Reproductive Organs. (Eds.): R. J. Kurman, M. L. Carcangiu, C. S. Herrington, R. H. Young. *IARC*: Lyon. 2014. 307 p.
147. Inguinal lymph node squamous cell carcinoma of unknown primary site: a case report. V. Pai, K. Kattimani, V. Manohar, S. Ravindranath. *Journal of surgery and operative care*. 2016. Vol. 1 (2). P. 208.
148. Evaluation of Ki-67, p16 and CK17 markers in differentiation of cervical intraepithelial neoplasia and benign lesions. F. S. Aslani, A. Safaei, M. Pourjabali, M. Momtahan. *Iran J Med Sci*. 2013. Vol. 38 (1). P. 15-21.
149. Туманский В. А., Пирогова З. А. Особенности иммуногистохимической экспрессии Ki-67, p16INK4a, HPV16 в цервикальной интраэпителиальной неоплазии и раке шейки матки. *Патология*. 2017. Т. 14, № 2 (40). С. 202–208. DOI: 10.14739/2310-1237. 2017.2.109298.
150. Роль агресивного потенціалу в індивідуалізації хіміопроменевого лікування хворих на рак шийки матки. В.С. Іванкова, Т.М. Нестеренко, Л.М. Барановська, Н.Н. Храновська. *Клиническая онкология*. 2015. № 4 (20) С. 77-80.

151. Променеві методи дослідження у моніторингу лікування хворих на метастатичний рак піхви. Т. С. Головка, В. С. Іванкова, О. О. Бакай та ін. *Клиническая онкология*. 2019, Т. 9, № 1 (33) С. 50-54.
152. Petrov S. V., Reikhlina N. T. editors: [Manual on immunohistochemical diagnostics of human tumors. 4th ed.]. Kazan: Title, 2012. 623 p.
153. World Health Organisation Classification of Tumours of Endocrine Organs (4th edition). (Eds): R. V. Lloyd, R. Y. Osamura, G. Kloppel, J. Rosai. IARC: Lyon 2017. 355 p.
154. World Health Organisation Classification of Tumours of the Digestive System (4th edition). (Eds): F. T. Bosman, F. Carneiro, R.H. Hruban, N. D. Theise IARC: Lyon 2010. 417 p.
155. Клінічні рекомендації з діагностики та лікування нейроендокринних пухлин шлунка дванадцятипалої кишки. Н. Г. Зубарев, Е. А. Колесник, А. В. Лукашенко та ін. *Клиническая онкология*. 2017. № 4 (28) С. 19-25.
156. Клінічні рекомендації з діагностики та лікування нейроендокринних пухлин тонкої кишки М. Г. Зубарев, О. О. Колесник, А. В. Лукашенко та ін. *Клиническая онкология*. 2018. Т. 8, № 1 (29) С. 3-10.
157. World Health Organisation Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs (4th edition). (Eds): H. Moch, P. A. Humphrey, T. M. Ulbright, V. E. Reuter. IARC: Lyon 2016. 400 p.
158. A case of metastatic cancer with markedly elevated PSA level that was not detected by repeat prostate biopsy. H. Iwamura, S. Hatakeyama, Y. Tanaka et al. *BMC Res Notes*. 2014. Vol. 7. P. 64. doi: 10.1186/1756-0500-7-64
159. Moul J. W. Hormone naïve prostate cancer: predicting and maximizing response intervals. *Asian Journal of Andrology*. 2015. Vol. 17. P. 929-935. doi: 10.4103/1008-682X.152821.
160. Pattern and distribution of distant metastases in anaplastic prostate carcinoma: a single-institute experience with 101 patients. D. Ganeshan, A. M. Aparicio, A. Morani, V. Kundra. *AJR*. 2017. Vol. 209. P. 327-332. doi: 10.2214/AJR.16.17214.

161. Bone metastases of unknown origin: epidemiology and principles of management. A. Piccioli, G. Maccauro, M. S. Spinelli et al. *J Orthopaed Traumatol*. 2015. Vol. 16. P. 81-86. doi: 10.1007/s10195-015-0344-0.
162. New primary malignancy masquerading as metastatic prostate adenocarcinoma. E. A. Szwed, S. Sliesoraitis, Th.-C. Nguyen [et al.] *Oncological Medicine*. 2015. Vol. 2015. P. 5. doi: 10.1155/2015/358572.
163. Ye L., Kynaston H. G., Jiang W. G. Bone metastasis in prostate cancer: Molecular and cellular mechanisms (Review). *International journal of molecular medicine*. 2007. Vol. 20. P. 103-111.
164. Prognostic factors for hormone sensitive metastatic prostate cancer: impact of disease volume. A. M. Alhanafy, F. Zanaty, R. Ibrahim, S. Omar. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2018. Vol. 19 (4). P. 1113-1118. doi: 10.22034/APJCP.2018.19.4.1113.
165. Body J.-J., Casimiro S., Costa L. Targeting bone metastases in prostate cancer: improving clinical outcome. *Nat. Rev. Urol*. 2015. Vol. 12. P. 340-356. doi: 10.1038/nrurol.2015.90.
166. Prognostic value of serum alkaline phosphatase in the survival of prostate cancer: evidence from a meta-analysis. D. Li, H. Lv, X. Hao [at al.]. *Cancer Management and Research*. 2018. Vol. 10. P. 3125-313. doi: 10.2147/CMAR.S174237.
167. Епідеміологічні передумови доцільності впровадження скринінгу коло ректального раку в Україні. З. П. Федоренко, О. О. Колеснік, Ю. Й. Михайлович та ін. *Клиническая онкология*. 2018. Т. 8, № 4 (32). С. 258-263.
168. Choi J., Nahm J. H., Kim S. K. Prognostic clinicopathologic factors in carcinoma of unknown primary origin: a study of 106 consecutive cases. *Oncotarget*. 2017. Vol. 8 (37). P. 62630-62640. doi: 10.18632/oncotarget.16021.

169. Correlations of Proliferation Markers, p53 Expression and Histological Findings in Colorectal Carcinoma. C. V. Georgescu, A. Săftoiu, C. C. Georgescu [at al.]. *J Gastrointestin Liver Dis*. 2007. 16 (2). P. 133-139.
170. High Ki67 expression is an independent good prognostic marker in colorectal cancer. N. Melling, C. M. Kowitz, R. Simon [at al.]. *J Clin Pathol*. 2016. Vol. 69 (3). P. 209-214. doi: 10.1136/jclinpath-2015-202985.
171. Associations of beta-catenin alterations and MSI screening status with expression of key cell cycle regulating proteins and survival from colorectal cancer. S. Wangefjord, J. Brändstedt, K. E. Lindquist [at al.]. *J. Diagn Pathol*. 2013. Vol. 8. P. 10. doi: 10.1186/1746-1596-8-10.
172. Nuclear expression and/or reduced membranous expression of β -catenin correlate with poor prognosis in colorectal carcinoma. A meta-analysis. Sh. Zhang, Z. Wang, J. Shan [at al.]. *Medicine (Baltimore)*. 2016. Vol. 95 (49) P. e5546. DOI: 10.1097/MD.0000000000005546.
173. AMACR expression in colorectal cancer is associated with left-sided tumor localization. A. Marx, P. Simon, R. Simon [at al.]. *Virchows Arch*. 2008. Vol. 453 (3). P. 243-248.
174. Shi X, Gong E, Wu X. Alpha-methylacyl-CoA racemase/P504S overexpression in colorectal carcinoma is correlated with tumor differentiation. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2007. Vol. 15 (2). P. 175-80. DOI: 10.1097/01.pai.0000213107.20355.d8.
175. Targeting the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) oncogene in colorectal cancer. S. Siena, A. Sartore-Bianchi, S. Marsoni [at al.]. *Annals of Oncology*. 2018. Vol. 29 (5). P. 1108-1119. doi: 10.1093/annonc/mdy100
176. Merkel cell carcinoma: Epidemiology, prognosis, therapy and unmet medical needs. D. Schadendorf, C. Lebbe, A. zur Hausen [at al.]. *European Journal of Cancer*. 2017. Vol. 71. P. 53-69. doi: 10.1016/j.ejca.2016.10.022.
177. Tai P. Au J. Skin cancer management – updates on Merkel cell carcinoma. *Ann Transl Med*. 2018. Vol. 6 (14). P. 282. doi: 10.21037/atm.2018.06.13.

178. Prognostic Factors in Merkel Cell Carcinoma: A Retrospective Single-Center Study in 90 Patients. M. Rastrelli, B. Ferrazzi, F. Cavallin et al. *Cancers*. 2018. Vol. 10. P. 350. doi: 10.3390/cancers10100350.
179. Merkel cell carcinoma: clinical presentation, prognostic factors, treatment and survival in 32 patients. C. Carneiro, J.C. Sbalchiero, B. R. Caiado Neto et al. *Rev Bras Cir Plást.* 2013. Vol. 28 (2). P. 196-200.
180. Recent Insights and Advances in the Management of Merkel Cell Carcinoma. P. Banks, S. Shahneen, D.E. Gyorki, et al. *American Society of Clinical Oncology*. 2016. Vol. 12 (7). P. 637-646. doi: 10.1200/JOP.2016.013367.
181. Merkel Cell Carcinoma of skin – current controversies and recommendations. A. Assouline, P. Tai, K. Joseph, et al. *Rare Tumors*. 2011. Vol. 3. P. e23. doi: 10.4081/rt.2011.e23.
182. Методики морфологічних досліджень: монографія; за ред. М. М. Багрія, В. А. Діброви. – *Нова Книга*, 2016. – 328 с.
183. Tony J. C. ImageJ for microscopy. *BioTechniques*. 2007. Vol. 43 (1). P. 25-30.
184. The ImageJ ecosystem: an open platform for biomedical image analysis. J. Schindelin, C. T. Rueden, M. C. Hiner, K. W. Eliceiri. *Mol. Reprod. Dev.* 2015. Vol. 2015. P. 1-12.
185. ImmunoRatio: a publicly available web application for quantitative image analysis of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and Ki-67. V. J. Tuominen, S. Ruotoistenmäki, A. Viitanen et al. *J. Breast Cancer Research*. 2010. Vol. 12 (4, R56). P. 1-12.
186. Development and evaluation of a virtual microscopy application for automated assessment of Ki-67 expression in breast cancer. J. Konsti, M. Lundin, H. Joensuu et al. *BMC Clin Pathol*. 2011. Vol. 11 (3). P. 1-11.
187. Royston P. Remark AS R94: A remark on Algorithm AS 181: The W test for normality. *Applied Statistics*. 1995. Vol. 44. P. 547-551. doi: 10.2307/2986146.

188. Автандилов Г. Г. Основы количественной патологической анатомии / Г.Г. Автандилов. – М.: Медицина, 2002. – 240 с.
189. 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.
190. Пославська О. В. Методологія використання програмного забезпечення для аналізу цифрових мікрофотографій на базі курсу патоморфології з метою підвищення професійного рівня студентів, аспірантів, здобувачів вищих медичних закладів. *Морфологія*. 2015. Т. 9, № 3. С. 122-126.
191. Морфометричний аналіз «панцитокератин-позитивних» непластичних уражень лімфатичних вузлів шиї. 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..
192. Морфометричний аналіз «панцитокератин-негативних» непластичних уражень лімфатичних вузлів шиї. 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>.
193. Особливості імуногістохімічної діагностики меланоцитарних новоутворень. І. С. Шпонька, О. В. Пославська, П. О. Гриценко та ін. *Морфологія*. 2013. Т. VII, № 4. С. 91-96.
194. 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.
195. 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.

196. 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.
197. 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.*
198. Пославська О. В., Алексєєнко О. А., Чекан С. М. Дослідження «панцитокератин-негативних» непластичних ушкоджень лімфатичних вузлів шийї: імуноморфологічні аспекти. *Актуальні питання біології та медицини: матеріали Всеукраїнської наукової конференції (м. Суми, 16-17 листопада 2017 р.)*. Суми, 2017. С. 50.
199. 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>.
200. 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>.
201. 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. 127-133. DOI: <https://doi.org/10.26641/23071997-9665.2018.3.127-132>.

202. 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.
203. 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.
204. 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. 18, №1 (45). С. 67-72. DOI: 10.14739/2310-1237.2019.1.166308.
205. Savchenko O., Poslavska O., Savchenko P. Carcinose papillaire abdominal sans localization primaire chez les femmes: donnees statistiques, caracteristiques morphologiques rt immunophenotypes. *Langues, Sciences et Pratiques: actes du 2 Colloque international francophone et Ukraine (Dnipro, 3-4octobre, 2018)*. Dnipro, 2018. С. 185-186.
206. 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.
207. Пославська О. В., Савченко П. В. Особливості карцином невідомої первинної локалізації з ізольованим одностороннім ураженням пахвових лімфатичних вузлів у жінок. *Сьогодення біологічної науки: II Міжнародна наукова конференція (м. Суми, 9-10 листопада 2018 р.)*. Суми, 2018. С.229-232.

208. Пославська О. В. 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.
209. Пославська О. В. Ізольовані метастази кісток у чоловіків із підвищенням сироваткового маркера 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 2018p.) Nowy Sacz, Poland, 2018. P. 224-225.
210. 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.
211. Savchenko O., Poslavska O., Savchenko P. L`etude du phenotype immunohistochimie des metastasesbdans les ganglions axillaires de la tumeur sans localization 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.
212. 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.

213. Пославська О. В., Шпонька І. С. Плоскоклітинний рак невідомої первинної локалізації: ізольоване ураження лімфатичних вузлів шиї. *Медичні перспективи*. 2018, Том XXIII, №2. С. 13-20. DOI: <https://doi.org/10.26641/2307-0404.2018.2.133692>.
214. 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.
215. 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.
216. Пославська О. В., Шпонька І. С., Бабій Г. С. Діагностичне значення маркера p16INK 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>.
217. Пославська О. В. Особливості імуногістохімічної діагностики нейроендокринних пухлин. *Морфологія*. 2015. Т. 9, № 4. С. 66-71.
218. 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.
219. 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.
220. 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.
221. 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>.
222. Poslavs'ka O. V. Immunohistochemical features of neuroendocrine tumors. *Сучасні теоретичні та практичні аспекти клінічної медицини: тези доп. наук.- практи. 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.
223. 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.-практи. конф. (м. Вінниця, 10-11 квітня 2019 р.)*. Вінниця : ТОВ «Твори», 2019. С. 89-91.
224. 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).
225. 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».
226. Beganovic S. Clinical significance of the KRAS mutation. *Bosn J Basic Med Sci*. 2009. Vol. 9 (1). P. S17–S20.

227. von Eyben F. E. Chromosomes, genes, and development of testicular germ cell tumors. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 2004. Vol. 151 (2). P. 93-138.
228. HER-2/neu expression in germ cell tumours. S. Soule, L. Baldrige, K. Kirkpatrick et al. *J Clin Pathol*. 2002. Vol. 55. P. 656-658.
229. Phillips V., Kelly P., McCluggage W. G. Increased p16 expression in high-grade serous and undifferentiated carcinoma compared with other morphologic types of ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Pathol*. 2009. Vol. 28 (2). P. 179-186.
230. Differential mechanisms of CDKN2A (p16) alteration in oral tongue squamous cell carcinomas and correlation with patient outcome. A. M. Lim, H. Do, R. J. Young et al. *Int. J. Cancer*. 2014. Vol. 135. P. 887-895.
231. p16 Expression in Prostate Cancer and Nonmalignant Lesions: Novel Findings and Review of the Literature. A. Remo, M. Pancione, C. Zanella et al. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2016. Vol. 24 (3). P. 201-206.
232. p16 protein is upregulated in a stepwise fashion in colorectal adenoma and colorectal carcinoma. M. Al-Ahwal, W. Goma, E. Emam et al. *Gastroenterol*. 2016. Vol. 22. P. 435-440.
233. 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>.
234. Poslavska O. V., Shponka I. S. Features of the expression of prognostic markers p16, Her2 / 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. 95-98 р.

235. Некоторые аспекты изучения гистологических типов новообразований яичника Л. С. Болгова, О. М. Грабовой, С. В. Мариненко и др. *Клиническая онкология*. 2016. № 1 (21) С. 44-46.
236. Аналіз проліферативної активності та рівнів експресії діагностичних цитокератинів в епітеліальних пухлинах яєчників з різним потенціалом злоякісності. О. А. Савченко, І. С. Шпонька, О. В. Пославська та ін. *Морфологія*. 2017. Т. 11, № 4. С. 48-52.
237. Дубинина В. Г., Рыбин А. И. Роль сульфгидрильных групп в формировании резистентности серозного рака яичника к препаратам платины. *Клиническая онкология*. 2016. № 2 (22) С. 46-48.
238. Інформативність комп'ютерної томографії в діагностиці карциноматозу очеревини у хворих на рак яєчника. М. Т. Фецич, Н. А. Володько, Ю. П. Милян и др. *Клиническая онкология*. 2015. № 4 (20) С. 91-94.
239. Мариненко С. В., Болгова Л. С. Современная дифференциальная цитологическая диагностика аденокарциномы, мезотелиомы и реактивного серозита. *Клиническая онкология*. 2018. Т. 8, № 1 (29) С. 74-78.
240. Псевдоміксосома очеревини: інкурабельна казуїстична патологія чи необхідність проактивної тактики комбінованого лікування? Р. Р. Ярема, Б. Моран, Т. Сесил та ін. *Клиническая онкология*. 2016. № 2 (22) С. 26-31.
241. Рыбин А. И. Роль протеомічних та генетичних предикторів виживаності хворих на рак яєчників. *Клиническая онкология*. 2016. № 3 (23) С. 31-33.
242. Molecular characterisation and liquid biomarkers in Carcinoma of Unknown Primary (CUP): taking the 'U' out of 'CUP'. A. Conway, C. Mitchell, E. Kilgour et al. *Br J Cancer*. 2019. Vol. 120. P. 141-153. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0332-2>.
243. Свінціцький В. С., Єгоров М. Ю. Патогенетичні концепції і лікування серозного раку яєчника початкових стадій на сучасному етапі. *Клиническая онкология*. 2018. Т. 8, № 3 (31) С. 170-173.

244. Можливості променевого методу у діагностиці злоякісних пухлин яєчника. Г. В. Лаврик, Т. С. Головка, Л. А. Шевчук та ін. *Клиническая онкология*. 2019. Т. 9, № 1 (33) С. 34-41.
245. PDK1 is Expressed in Ovarian Serous Carcinoma and Correlates with Improved Survival in High-grade Tumors. P. Lohneis, S. Darb-Esfahani, M. Dietel et al. *Anticancer research*. 2015. Vol. 35: 6329-6334.
246. p16/CDKN2A FISH in Differentiation of Diffuse Malignant Peritoneal Mesothelioma From Mesothelial Hyperplasia and Epithelial Ovarian Cancer. T. Ito, M. Hamasaki, S. Matsumoto et al. *Am J Clin Pathol*. 2015. Vol. 143. P. 830-838.
247. HER2 Status in Ovarian Carcinomas: A Multicenter GINECO Study of 320 Patients. M. Tuefferd, J. Couturier, F. Penault-Llorca et al. *PLoS One*. 2007. Vol. 2 (11). P. e1138.
248. Stromal p16 expression is significantly increased in endometrial carcinoma. G. Yoon, C. W. Koh, N. Yoon et al. *Oncotarget*. 2017. Vol. 8. P. 4826-4836.
249. Stromal p16 expression is significantly increased in malignant ovarian neoplasms. N. Yoon, G. Yoon, C. K. Park et al. *Oncotarget*. 2016. Vol. 7. P. 64665-64673.
250. Кукушкина С. Н., Фильчаков Ф. В. Клетки адаптивного иммунитета: возможность использования в качестве прогностических факторов в клинических исследованиях рака грудной железы (обзор литературы). *Клиническая онкология*. 2018. Т. 8, № 1 (29) С. 28-33.
251. Роль мутацій гена ESR1 у розвитку резистентності до гормонотерапії у хворих із люмінальними підтипами раку грудної залози. Л. А. Сивак, Т. Є. Тарасенко, С. А. Лялькін та ін. *Клиническая онкология*. 2018. Т. 8, № 1 (29) С. 24-27.
252. CUP syndrome – metastatic malignancy with unknown primary tumor. G. Zaun, M. Schuler, K. Herrmann et al. *Dtsch Arztebl Int*. 2018. Vol. 115. P. 157-162.

253. The impact of locoregional treatment on survival of patients with primary metastatic breast cancer. R. Liubota, V. Cheshuk, R. Vereshchako et al. *Exp Oncol.* 2017. Vol. 39 (1). P. 75-77.
254. Circulating tumor cells in breast cancer: functional heterogeneity, pathogenetic and clinical aspects. N. V. Cherdyntseva, N. V. Litviakov, E. V. Denisov et al. *Exp Oncol.* 2017. Vol. 39 (1). P. 2-11.
255. Significance of iodine symporter for prognosis of the disease course and efficacy of neoadjuvant chemotherapy in patients with breast cancer of luminal and basal subtypes. V. F. Chekhun, A. V. Andriiv, N. Yu. Lukianova et al. *Exp Oncol.* 2017. Vol. 39 (1). P. 65-68.
256. Molecular-genetic models for prognosis of development of tumors of reproductive system in women with family history of cancer. O. V. Paliychuk, L. Z. Polishchuk, Z. I. Rossokha et al. *Exp Oncol.* 2018. Vol. 40 (1). P. 59-67.
257. Clinical and immunohistochemical features of primary breast cancer and metachronous ovarian and endometrial tumors. A. E. Kryzhanivska, I. B. Dyakiv, I. Kyshakevych. *Exp Oncol.* 2018. Vol. 40 (2). P. 124-127.
258. Analysis of the survival of patients with breast cancer depending on age, molecular subtype of tumor and metabolic syndrome. S. M. Grybach, L. Z. Polishchuk, V. F. Chekhun. *Exp Oncol.* 2018. Vol. 40 (3). P. 243-248.
259. Different morphological structures of breast tumors demonstrate individual drug resistance gene expression profiles. T. S. Gerashchenko, E. V. Denisov, N. M. Novikov et al. *Exp Oncol.* 2018. Vol. 40 (3). P. 228-234.
260. Overexpression of the mitochondrial ribosomal protein S18-2 in the invasive breast carcinomas. L. G. Buchynska, N. P. Iurchenko, E. V. Kashuba et al. *Exp Oncol.* 2018. Vol. 40 (4). P. 303-308.
261. Нітефор Л. В. Клінічні особливості імуногістохімічної діагностики сарком та філоїдних пухлин грудної залози. *Актуальні питання педіатрії, акушерства та гінекології.* 2017. № 2. С. 67-573. DOI 10.11603/24116-4944.2017.2.8036

262. Скрининг рака предстательной железы. Э. А. Стаховский, З. П. Федоренко, Ю. В. Витрук та ін. *Клиническая онкология*. 2016. № 1 (21). С. 50-53.
263. Стан організації онкологічної допомоги хворим зі злоякісними новоутвореннями чоловічих сечостатевих органів в Україні. З. П. Федоренко, Л. О. Гулак, А. Ю. Рижов та ін. *Клиническая онкология*. 2017. № 3 (27). С. 39-44.
264. Idowu B. M. Prostate carcinoma presenting with diffuse osteolytic metastases and supraclavicular lymphadenopathy mimicking multiple myeloma. *Clinical Case Reports*. 2018. Vol. 6 (2). P. 253-257. doi:10.1002/ccr3.1336.(CCR3-6-253).
265. Challenges and recommendations for early identification of metastatic disease in prostate cancer. E. D. Crawford, N. N. Stone, E. Y. Yu et al. *Urology*. 2014. Vol. 83 (3). P. 664-669. doi: 10.1016/j.urology.2013.10.026.
266. Predictive value of serum prostate specific antigen in detecting bone metastasis in prostate cancer patients using bone scintigraphy. K. K. Kamaleshwaran, B. R. Mittal, C. N. B. Harisankar et al. *Indian J Nucl Med*. 2012 Apr-Jun; 27(2): 81–84. doi: 10.4103/0972-3919.110683.
267. Pathogenesis of Osteoblastic Bone Metastases From Prostate Cancer. T. Ibrahim, E. Flamini, L. Mercatali et al. *Cancer*. 2010. Vol. 116 P. 1406-1418. (cncr.24896). doi: 10.1002/cncr.24896.
268. Should prostate cancer be considered as a differential diagnosis in patients with osteolytic bone lesions? M. U. Bakhsh, S. Lee, S. Ahmad et al. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015. Vol. 19 (24). P. 4791-4794.
269. Jin J.-K., Dayyani F., Gallick G. E. Steps in prostate cancer progression that lead to bone metastasis. 2011. *Int. J. Cancer*. Vol. 128. P. 2545-2561. (ijc.26024). doi: 10.1002/ijc.26024.
270. Metastatic Carcinoma of the Long Bones. A. I. Rissio, F. M. Wodajo, M. Malawer. *American Family Physician*. 2007. Vol. 76 (10). P. 1489-1494. Increased KIF4A expression is a potential prognostic factor in prostate can-

- cer H. Gao, X. Chen, Q. Cai et al. *Oncology letters*. 2018. 15. P. 7941-7947. DOI: 10.3892/ol.2018.8322.
271. Expression of cancer-associated genes in prostate tumors. E. E. Rosenberg, G. V. Gerashchenko, N. V. Hryshchenko et al. *Exp Oncol*. 2017. Vol. 39 (2). P. 131-137. doi: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000995>.
272. Expression pattern of genes associated with tumor microenvironment in prostate cancer. G. V. Gerashchenko, O. V. Grygoruk, O. A. Kononenko et al. *Exp Oncol*. 2018. Vol. 40 (4). P. 315-322. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.00095E>.
273. Зіменковський А. Б., Заяць М. М., Криштопа М. В. Фармакоеконімічні особливості застосування аналогів лютеїнізуючого гормону — рилизінг-гормону при раку передміхурової залози. *Клиническая онкология*. 2016. № 1 (21). С. 54-57.
274. Михайлович Ю. Й., Звірич В. В., Колеснік О. О. «Колоректальний скринінг» як консенсусне вирішення проблеми місцево-поширеного раку товстої та прямої кишки в Україні. Дискусії і питання. *Клиническая онкология*. 2017. № 4 (28). С. 13-18.
275. Галайчук І. Й., Білянський Л. С. TNM-класифікація раку товстої кишки 8-го перегляду (2017): клінічне застосування. *Хірургія України*. 2018. № 2. С. 7-10.
276. Вживаність хворих на рак ободової кишки. Б. Б. Татарин, А. Є. Крижанівська, В. Р. Романчук та ін. *Клиническая онкология*. 2018. Т. 8, № 1 (29). С. 53-56.
277. Вміст ДНК у ядрах клітин аденокарцином товстої кишки та експресія Bcl-2 і p53. О. М. Грабовий, С. А. Антонюк, В. П. Сільченко та ін. *Клиническая онкология*. 2015. № 2 (18). С. 18-21.
278. Shyshkin M. A., Khrystenko T. O. Distal colonic polyps: immunohistochemical study of proliferation and apoptosis. *Морфологія*. 2019. Т. 13, № 1. С. 67-75. DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2019.1.67-75>.

279. Kurtenkov O., Bubina M., Klaamas K. Signatures of anti-thomsen – friedreich antigen antibody diversity in colon cancer patients. *Experimental Oncology*. 2018. Vol. 40, N 1. P. 48-58.
280. Шишкин М. А. Молекулярно-иммуногистохимическая характеристика пролиферации и апоптоза опухолевых клеток колоректальной аденокарциномы. *Патология*. 2018. Т. 15, № 1 (42). С. 49-56. DOI: 10.14739/2310-1237. 2018.1.129447 .
281. Grabovoy A. N., Antoniuk S. A., Savchyn T. M. Colon adenocarcinoma histological grading based on multivariable analysis of the status of tumor cell nuclear apparatus. *Клиническая онкология*. 2018. Т. 8, № 1 (29). С. 69-73.
282. Кумар В. Основы патологии за Роббинсом : переклад 10-го англ. вид. : у 2 т. Т. 1 / Віней Кумар, Абул К. Аббас, Джон К. Астер ; наук. ред. перекладу проф. І. Сорокіна, С. Гичка, І. Давиденко. – К. : ВСВ «Медицина», 2019. – XII, 420 с.
283. Кумар В. Основы патологии за Роббинсом : переклад 10-го англ. вид. : у 2 т. Т. 2 / Віней Кумар, Абул К. Аббас, Джон К. Астер ; наук. ред. перекладу проф. І. Сорокіна, С. Гичка, І. Давиденко. – К. : ВСВ «Медицина», 2020. – XII, 532 с.
284. Досвід виконання резекцій печінки у хворих на метастатичний колоректальний рак. О. О. Колеснік, А. А. Бурлака, А. В. Лукашенко та ін. *Клиническая онкология*. 2015. № 2 (18). С. 14-17.
285. Шишкин М. А., Туманський В. О. Особливості транскрипційної активності генів CDH1, CTNNB1 та експресії кодованих ними молекул Е-кадгерину, β-катеніну на I, II, III, IV стадіях розвитку колоректальної аденокарциноми. *Патология*. 2018. Т. 15, № 2(43). С. 221-228. DOI: 10.14739/2310-1237. 2018.2.141432.
286. Пономарева О. В., Рыспаева Д. Э., Сивак Л. А. Иммуноterapia колоректального рака: современные представления и перспективы. *Клиническая онкология*. 2018. Т. 8, № 4 (32). С. 232-238.

287. Шишкин М. А. MUC1, MUC2, MUC4, MUC5AC, CDX-2: характеристика иммуногистохимической экспрессии в полипах и аденокарциноме дистальных отделов толстого кишечника. *Патология*. 2019. Т. 16, № 1 (45). С. 73-80. DOI: 10.14739/2310-1237. 2019.1.166313
288. Wong H. H., Chu P., Wong H. H. Immunohistochemical features of the gastrointestinal tract tumors. *J. Gastrointest Oncol*. 2012. Vol. 3 (3). P. 262-284.
289. Бухарін Т. В., Яковенко В. А., Курик Е. Г. Перстневидно-клеточная колоректальная карцинома (обзор литературы, случай из практики). *Клиническая онкология*. 2017. № 1 (25). С. 11-13.
290. Жирова тканина та її роль у мікрооточенні клітин аденокарциноми колоректального раку. А. А. Бурлака, А. В. Вовк, В. В. Звірич та ін. *Клиническая онкология*. 2019. Т. 9, № 1 (33). С. 30-33.
291. Mediastinal yolk sac tumor infiltrating the heart. R. Imaniar, E. Syahrudin, P. Z. Soepandi et al. *Exp Oncol*. 2018. Vol. 40 (1). P. 82-84. <http://dspace.nbuv.gov.ua/handle/123456789/139256>.
292. Pavlidis N., Pentheroudakis G. Cancer of unknown primary site. *The Lancet*. 2012. Vol. 379 (9824). P. 1428-1435. doi: 10.1016/S0140-6736(11)61178-1.
293. Скоморохова Т. В. Сучасний стан проблеми лікування хворих зі злоякісними новоутвореннями верхніх дихальних шляхів (огляд літератури та результати власних досліджень). *Клиническая онкология*. 2017. № 3 (27) С. 35-38.
294. Шийна лімфодисекція з виявленням сторожового лімфатичного вузла у хворих на рак порожнини рота та ротоглотки. В. С. Процик, О. В. Кравець, О. М. Трембач та ін. *Клиническая онкология*. 2013. № 4 (12) С. 1-4.
295. Коробко Е. В. Роль иммунотерапии в комплексном лечении больных раком ротовой полости: взгляд клинического онколога. *Клиническая онкология*. 2018. Т. 8, № 4 (32) С. 239-241.

296. Русин А. В., Петросов О. В., Чумак А. І. Клінічний випадок одночасного діагностування плоскоклітинного раку і фібрোসаркоми гортані. *Клиническая онкология*. 2015. № 4 (20) С. 33-38.
297. High-Risk Human Papillomavirus Is Transcriptionally Active in a Subset of Sinonasal Squamous Cell Carcinomas. A. B. Larque, S. Hakim, J. Ordi et al. *Mod Pathol*. 2014. Vol. 27 (3). P. 343-351. doi: 10.1038/modpathol.2013.155.
298. Carcinoma of unknown primary in the inguinal lymph node region of squamous cell origin: A case series. K. Joseph, M. B. Sawyer, J. Amanie et al. *PRO*. 2014. Vol. 4 (6), P. 404-408. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.prro.2013.12.007>.
299. Ray M. D., Vatsal S., Kumar S. Metastatic inguinal lymph nodes with two different histological types in a case of carcinoma of unknown primary site. *J Cancer Metastasis Treat* 2015. Vol. 1: P.101-103. doi:10.4103/2394-4722.157178.
300. Varadhachary G. R., Raber M. N. Cancer of unknown primary site. *N. engl. J. Med*. 2014. Vol. 371. P. 757-765. doi: 10.1056/NEJMra1303917.
301. TTF-1 positive small cell cancers: Don't think they're always primary pulmonary! L. Verset, M. Arvanitakis, P. Loi et al. *World J Gastrointest Oncol*. 2011. Vol. 3 (10). P. 144-147. doi: 10.4251/wjgo.v3.i10.144.
302. Travis W. D. Update on small cell carcinoma and its differentiation from squamous cell carcinoma and other non-small cell carcinomas. *Modern Pathology*. 2012. Vol. 25. P. S18–S30. doi:10.1038/modpathol.2011.150.
303. Jagirdar J. Application of Immunohistochemistry to the Diagnosis of Primary and Metastatic Carcinoma to the Lung. *Arch Pathol Lab Med*. 2008. Vol. 132. P. 384-396. doi: 10.1043/1543-2165(2008)132[384:AOITTD]2.0.CO;2.
304. Immunohistochemical distinction between merkel cell carcinoma and small cell carcinoma of the lung. M. Bobos, P. Hytiroglou, I. Kostopoulos et al.

- Am J Dermatopathol.* 2006. Vol. 28 (2). P. 99-104. DOI: 10.1097/01.dad.0000183701.67366.c7.
305. Merkel cell carcinoma can be distinguished from metastatic small cell carcinoma using antibodies to cytokeratin 20 and thyroid transcription factor 1. S. N. Leech, A. J. O. Kolar, P. D. Barrett et al. *Clin Pathol.* 2001. Vol. 54. P. 727-729. doi: 10.1136/jcp.54.9.727.
306. Morphologic and immunophenotypical features distinguishing Merkel cell polyomavirus-positive and negative Merkel cell carcinoma. T. Kervarrec, A. Tallet, E. Miquelestorena-Standley et al. *Modern Pathology.* 2019. Vol. 32. P. 1605-1616. doi: 10.1038/s41379-019-0288-7.
307. Aberrant expression of ALK and EZH2 in Merkel cell carcinoma. T. Veija, V. Koljonen, T. Bohling. *BMC Cancervolume.* 2017. Vol. 17. P. 236. doi: 10.1186/s12885-017-3233-5.
308. Familial Risk in Patients With Carcinoma of Unknown Primary. N. J. Samadder, K. R. Smith, H. Hanson et al. *JAMA Oncol.* 2016. Vol. 2 (3). P. 340-345. doi:10.1001/jamaoncol.2015.4265.

ДОДАТОК А1

"ЗАТВЕРДЖУЮ"
 Заступник директора з навчально-методичної роботи
 Медичного інституту СДУ
 к.б.н., доцент Д.О. Дримона
 " 22 " 2019р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Пропозиції для впровадження: спосіб діагностики пухлини невідомої первинної локалізації, заснований на визначенні комплексу імуногістохімічних властивостей та морфометричних показників клітин досліджуваних метастазів.

2. Установа розробника: державний заклад «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», 49044, м. Дніпро, вул. В.Вернадського, буд. 9; автори: к.м.н. доцент кафедри патологічної анатомії і судової медицини ДЗ «ДМА МОЗ України» Пославська О.В., перший проректор ДЗ «ДМА МОЗ України», д.мед.н., професор кафедри патологічної анатомії і судової медицини Шпонька І.С.

3. Джерела інформації:

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

Морфометричний аналіз «панцитокератин-позитивних» непласических уражень лімфатичних вузлів ший / О.В. Пославська, І.С. Шпонька, П.О. Гриценко, О.А. Алексєєнко // Патологія. – 2017. – Т.14. – №3. – С. 287-292.

Пославська О.В. Плоскоклітинний рак невідомої первинної локалізації: ізольоване ураження лімфатичних вузлів ший / О.В. Пославська, І.С. Шпонька // Медичні перспективи. – 2018. – Т. XXIII. – №2. – С. 13-20.

4. Впроваджено: принципи діагностики пухлини невідомої первинної локалізації.

5. Термін впровадження: 01.05.2019-30.09.2019р.

6. Базова установа, яка проводить впровадження: кафедра патологічної анатомії Сумського державного університету.

7. Форма впровадження: в навчальний процес – в матеріали лекцій і практичних занять з патоморфології, а також в наукову роботу кафедри.

8. Зауваження і пропозиції: не вносилися

Пропозиція обговорена та затверджена на методичному засіданні кафедри патологічної анатомії Медичного інституту СДУ (протокол № 6 від 25.11.2019р).

Завідувач кафедри патологічної анатомії
 Медичного інституту
 Сумського державного університету
 д.м.н., проф.



А.М. Романов

ДОДАТОК А2

"ЗАТВЕРДЖУЮ"

Проректор з науково-педагогічної роботи
ВДНЗ «Буковинський державний медичний
університет»
доцент _____ І.В.Груш
2019р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Пропозиції для впровадження: спосіб діагностики пухлини невідомої первинної локалізації, заснований на визначенні комплексу імуногістохімічних властивостей та морфометричних показників клітини досліджуваних метастазів.

2. Установа розробника: державний заклад «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», 49044, м. Дніпро, вул. В.Вернадського, буд. 9; автори: к.м.н. доцент кафедри патологічної анатомії і судової медицини ДЗ «ДМА МОЗ України» Пославська О.В., перший проректор ДЗ «ДМА МОЗ України», д.мед.н., професор кафедри патологічної анатомії і судової медицини Шпоцька І.С.

3. Джерела інформації:

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

Морфометричний аналіз «пацинтокератин-позитивних» нееластичних уражень лімфатичних вузлів шні / О.В. Пославська, І.С. Шпоцька, П.О. Гринцанко, О.А. Алексєнко // Патологія. – 2017. – Т.14. – №3. – С. 287-292.

Пославська О.В. Плоскоклітинний рак невідомої первинної локалізації: ізольоване ураження лімфатичних вузлів шні / О.В. Пославська, І.С. Шпоцька // Медичні перспективи. – 2018. – Т. XXIII. – №2. – С. 13-20.

4. Впроваджено: принципи діагностики пухлини невідомої первинної локалізації.

5. Термін впровадження: 01.05.2019-30.09.2019р.

6. Базова установа, яка проводить впровадження: кафедра патологічної анатомії ВДНЗ «Буковинський державний медичний університет».

7. Форма впровадження: в навчальний процес – в матеріали лекцій і практичних занять з патоморфології, а також в наукову роботу кафедри.

8. Зауваження і пропозиції: не вносилися

Пропозиція обговорена та затверджена на методичному засіданні кафедри патологічної анатомії ВДНЗ «Буковинський державний медичний університет»
(протокол № 8 від 11.12 2019 р).

Завідувач кафедри патологічної анатомії
ВДНЗ «Буковинський державний медичний університет»
д.мед.н., професор

І.С. Давиденко

ДОДАТОК АЗ

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Головний лікар
Кіровоградської обласної лікарні

 І.М. Андрусів
2019 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиції для впровадження:** спосіб діагностики пухлини невідомої первинної локалізації, заснований на визначенні комплексу імуногістохімічних властивостей та морфометричних показників клітин досліджуваних метастазів.
2. **Установа розробника:** державний заклад «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», 49044, м. Дніпро, вул. В.Вернадського, буд. 9; автори: к.м.н. доцент кафедри патологічної анатомії і судової медицини ДЗ «ДМА МОЗ України» Пославська О.В., перший проректор ДЗ «ДМА МОЗ України», д.мед.н., професор кафедри патологічної анатомії і судової медицини Шпонька І.С.
3. **Джерела інформації:**
Пославська О.В. Визначення лінійних розмірів та площ окремих морфологічних об'єктів на мікрофотографіях за допомогою програми ImageJ / О.В. Пославська // Морфологія. – 2016. – Т.10. – №3. – С. 377-381.
Морфометричний аналіз «панцигокератин-позитивних» непластичних уражень лімфатичних вузлів ший / О.В. Пославська, І.С. Шпонька, П.О. Гриценко, О.А. Алексетенко // Патологія. – 2017. – Т.14. – №3. – С. 287-292.
4. Пославська О.В. Плоскоклітинний рак невідомої первинної локалізації: гольоване ураження лімфатичних вузлів ший / О.В. Пославська, І.С. Шпонька // Медичні перспективи. – 2018. – Т. XXIII. – №2. – С. 13-20.
5. **Впроваджено:** в патологоанатомічному відділенні Кіровоградської обласної лікарні.
6. **Строки впровадження:** 01.02.2019-01.11.2019 р.
7. **Ефективність впровадження у відповідності з критеріями, викладеними в джерелі інформації (п.3)**

Показники	За даними	
	Розробників	Впроваджуючої установи
Зменшення кількості карцином з невизначеною локалізацією, на %	85,5%	83,5%

8. **Зауваження, додатки:** не вносились.

Відповідальний за впровадження,
зав. патологоанатомічним відділенням



С.С. Немценко

«13» грудня 2019 р.

ДОДАТОК А4



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Пропозиції для впровадження: спосіб діагностики пухлини невідомої первинної локалізації, заснований на визначенні комплексу імуногістохімічних властивостей та морфометричних показників клітин досліджуваних метастазів.

2. Установа розробника: державний заклад «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», 49044, м. Дніпро, вул. В.Вернадського, буд. 9; автори: к.м.н. доцент кафедри патологічної анатомії і судової медицини ДЗ «ДМА МОЗ України» Пославська О.В., перший проректор ДЗ «ДМА МОЗ України», д.м.н., професор кафедри патологічної анатомії і судової медицини Шпонька І.С.

3. Джерела інформації:

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

Морфометричний аналіз «панцитокератин-позитивних» нееластичних уражень лімфатичних вузлів шиї / О.В. Пославська, І.С. Шпонька, П.О. Гриценко, О.А. Алексєнко // Патологія. – 2017. – Т.14. – №3. – С. 287-292.

Пославська О.В. Плоскоклітинний рак невідомої первинної локалізації: ізольоване ураження лімфатичних вузлів шиї / О.В. Пославська, І.С. Шпонька // Медичні перспективи. – 2018. – Т. XXIII. – №2. – С. 13-20.

4. Впроваджено: принципи діагностики пухлини невідомої первинної локалізації.

5. Термін впровадження: 01.05.2019-30.09.2019р.

6. Базова установа, яка проводить впровадження: кафедри патологічної анатомії і судової медицини Запорізького державного медичного університету.

7. Форма впровадження: в навчальний процес – в матеріали лекцій і практичних занять з патоморфології, а також в наукову роботу кафедри.

8. Зауваження і пропозиції: не вносилися

Пропозиція обговорена та затверджена на методичному засіданні кафедри патологічної анатомії і судової медицини ЗДМУ (протокол №/В від 31.10 2019р).

Завідувач кафедри патологічної анатомії
і судової медицини ЗДМУ
д.м.н., проф.

С.І. Терещук

ДОДАТОК А5



1. Пропозиції для впровадження: спосіб діагностики пухлини невідомої первинної локалізації, заснований на визначенні комплексу імуногістохімічних властивостей та морфометричних показників клітин досліджуваних метастазів.

2. Установа розробника: державний заклад «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», 49044, м. Дніпро, вул. В.Вернадського, буд. 9; автори: к.м.н. доцент кафедри патологічної анатомії і судової медицини ДЗ «ДМА МОЗ України» Пославська О.В., перший проректор ДЗ «ДМА МОЗ України», д.мед.н., професор кафедри патологічної анатомії і судової медицини Шпонька І.С.

3. Джерела інформації:

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

Морфометричний аналіз «панітокератин-позитивних» непластичних уражень лімфатичних вузлів ший / О.В. Пославська, І.С. Шпонька, П.О. Грищенко, О.А. Алексеев // Патологія. – 2017. – Т.14. – №3. – С. 287-292.

Пославська О.В. Плазмоклетинний рак невідомої первинної локалізації: імітоване ураження лімфатичних вузлів ший / О.В. Пославська, І.С. Шпонька // Медичні перспективи. – 2018. – Т. XXIII. – №2. – С. 13-20.

4. Впроваджено: принципи діагностики пухлини невідомої первинної локалізації.

5. Термін впровадження: 01.05.2019-30.09.2019р.

6. Базова установа, яка проводить впровадження: кафедра патологічної та топографічної анатомії НМАПО імені П.Л. Шупика.

7. Форма впровадження: в навчальний процес – в матеріали лекцій і практичних заняття з патоморфології, а також в наукову роботу кафедри.

8. Зауваження і пропозиції: не вносилися

Пропозиція обговорена та затверджена на методичному засіданні кафедри патологічної та топографічної анатомії НМАПО імені П.Л. Шупика (протокол № 10 від 29 жовтня 2019 р.).

Завідуюча кафедри патологічної та топографічної анатомії
НМАПО імені П.Л. Шупика
д.м.н., проф.



О.О. Дзлик

О.О. Дзлик
30.10.2019

ДОДАТОК А6

"ЗАТВЕРДЖУЮ"

Проректор з наукової роботи ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет»

д.мед.н., професор *Л.І. Вакалюк*

"16" *Вересня* 2019р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Пропозиції для впровадження: спосіб діагностики пухлини невідомої первинної локалізації, заснований на визначенні комплексу імуногістохімічних властивостей та морфометричних показників клітини досліджуваних метастазів.

2. Установа розробника: державний заклад «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», 49044, м. Дніпро, вул. В.Вернадського, буд. 9; автори: к.м.н. доцент кафедри патологічної анатомії і судової медицини ДЗ «ДМА МОЗ України» Пославська О.В., перший проректор ДЗ «ДМА МОЗ України», д.мед.н., професор кафедри патологічної анатомії і судової медицини Шпонька І.С.

3. Джерела інформації:

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

Морфометричний аналіз «панцитокератин-позитивних» непластичних уражень лімфатичних вузлів шиї / О.В. Пославська, І.С. Шпонька, П.О. Гриценко, О.А. Алексєєнко // Патологія. – 2017. – Т.14. – №3. – С. 287-292.

Пославська О.В. Плоскоклітинний рак невідомої первинної локалізації: ізольоване ураження лімфатичних вузлів шиї / О.В. Пославська, І.С. Шпонька // Медичні перспективи. – 2018. – Т. XXIII. – №2. – С. 13-20.

4. Впроваджено: принципи діагностики пухлини невідомої первинної локалізації.

5. Термін впровадження: 01.05.2019-30.09.2019р.

6. Базова установа, яка проводить впровадження: кафедри патологічної анатомії ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет».

7. Форма впровадження: а навчальний процес – в матеріалі лекцій і практичних заняття з патоморфології, а також в наукову роботу кафедри.

8. Зауваження і пропозиції: не вносилися

Пропозиція обговорена та затверджена на методичному засіданні кафедри патологічної анатомії ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет» (протокол № *2* від *11 Вересня* 2019р).

Завідувач кафедри патологічної анатомії
ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет»
д.м.н., проф.

E.O. Kindrativ

ДОДАТОК А7



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

- Пропозиції для впровадження:** створити діагностичні вузли первинної нервової локалізації, заснований на патоморфологічному комплексі імуногістохімічних властивостей та морфометричних показників клітин досліджуваних метастазів.
- Установа розробника:** державний заклад «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», 49044, м. Дніпро, вул. В.Вернадського, буд. 9, автори: к.м.н. доцент кафедри патологічної анатомії і судової медицини ДІ «ДМА МОЗ України» Пославська О.В., перший проректор ДІ «ДМА МОЗ України», д.м.н., професор кафедри патологічної анатомії і судової медицини Шпонька І.С.
- Джерела інформації:**
Пославська О.В. Визначення лінійних розмірів та площ окремих морфологічних об'єктів на мікрофотографіях за допомогою програми ImageJ / О.В. Пославська // Морфологія. – 2016. – Т.10. – №3. – С. 377-381.
Морфометричний аналіз «панцитокератинопозитивних» онкоцитів уряджель діфферентних вузлів пії / О.В. Пославська, І.С. Шпонька, О.О. Грищенко, О.А. Алюквітско // Патологія. – 2017. – Т.14. – №3. – С. 287-292.
- Пославська О.В. Невоскожлітаний рак великої нервової локалізації: геномне урядження діфферентних вузлів пії / О.В. Пославська, І.С. Шпонька // Медичні переясковни. – 2018. – Т. XXIII. – №2. – С. 13-20.
- Впроваджено:** в патологоанатомічному відділенні Полтавського обласного патологоанатомічного бюро.
- Строки впровадження:** 01.07.2019-01.11.2019 р.
- Ефективність впровадження у відповідності з критеріями, встановленими в джерелі інформації (п.3)**

Показники	За даними	
	Розробників	Впровадженні установа
Зменшення кількості кариніном з невіднаєсною локалізацією, на %	83,3%	83,3%

8. **Зауваження, додаткові висновки:**

Відповідальний за впровадження:
зав. відділенням загальної патології

Александров (підпис), ІШМ

Ольга (підпис) 2019 р.

ДОДАТОК А8



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Пропозиції для впровадження: спосіб діагностики пухлин невідомої первинної локалізації, заснований на визначенні комплексу імуногістохімічних властивостей та морфометричних показників клітин досліджуваних метастазів.

2. Установа розробника: державний заклад «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», 49044, м. Дніпро, вул. В.Вернадського, буд. 9; автори: к.м.н. доцент кафедри патологічної анатомії і судової медицини ДЗ «ДМА МОЗ України» Пославська О.В., перший проректор ДЗ «ДМА МОЗ України», д.мед.н., професор кафедри патологічної анатомії і судової медицини Шпонька І.С.

3. Джерела інформації:

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

Морфометричний аналіз «панцитокератин-позитивних» непластичних уражень лімфатичних вузлів ший / О.В. Пославська, І.С. Шпонька, П.О. Гриценко, О.А. Алексеєнко // Патологія. - 2017. - Т. 14. - №3. - С. 287-292.

Пославська О.В. Плоскоклітинний рак невідомої первинної локалізації: ізольоване ураження лімфатичних вузлів ший / О.В. Пославська, І.С. Шпонька // Медичні перспективи. - 2018. - Т. XXIII. -№2. - С. 13-20.

4. Впроваджено: принципи діагностики пухлин невідомої первинної локалізації.

5. Термін впровадження: 01.05.2019-30.09.2019р.

Базова установа, яка проводить впровадження: кафедра патологічної анатомії з секційним курсом «УМСА».

Форма впровадження: в навчальний процес - в матеріали лекцій і практичних занять з патоморфології, а також в наукову роботу кафедри.

Зауваження і пропозиції: не вносилися.

Пропозиція обговорена та затверджена на методичному засіданні кафедри патологічної анатомії з секційним курсом «УМСА» (протокол № 5 від 24.10.2019р).

Відповідальний за впровадження:
завідувач кафедрою патологічної
анатомії з секційним курсом «УМСА»
проф.



Старченко І.І.

ДОДАТОК А9

ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор з наукової роботи

ДЗ «ДМА МОЗ України»

д.мед.н., професор

В.Й. Мамогур

2019р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Пропозиції для впровадження: спосіб діагностики пухлин невідомої первинної локалізації, заснований на визначенні комплексу імуногістохімічних властивостей та морфометричних показників клітин досліджуваних метастазів.

2. Установа розробника: державний заклад «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», 49044, м. Дніпро, вул. В.Вернадського, буд. 9; автори: к.м.н. доцент кафедри патологічної анатомії і судової медицини ДЗ «ДМА МОЗ України» Пославська О.В., перший проректор ДЗ «ДМА МОЗ України», д.мед.н., професор кафедри патологічної анатомії і судової медицини Шпонька І.С.

3. Джерела інформації:

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

Морфометричний аналіз «панцитокератин-позитивних» непластичних уражень лімфатичних вузлів ший / О.В. Пославська, І.С. Шпонька, П.О. Гринченко, О.А. Алексєнко // Патологія. – 2017. – Т.14. – №3. – С. 287-292.

Пославська О.В. Особливості експресії прогностичних маркерів p16 в Her-2/new та зміни відповідних генів в окремих фенотипах раків невідомого походження / О.В. Пославська, І.С. Шпонька // Морфологія. – 2019. – Т.13. – №3. – С. 99-106.

4. Впроваджено: принципи діагностики пухлин невідомої первинної локалізації.

5. Термін впровадження: 01.05.2019-30.09.2019р.

6. Базова установа, яка проводить впровадження: кафедра патологічної анатомії і судової медицини ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України».

7. Форма впровадження: в навчальний процес – в матеріали лекцій і практичних занять з патоморфології, а також в наукову роботу кафедри.

8. Зауваження і пропозиції: не вносилися

Пропозиція обговорена та затверджена на методичному засіданні кафедри патологічної анатомії і судової медицини ДЗ «ДМА МОЗ України» (протокол №3 від 11.11.2019р).

Завідувач кафедри патологічної анатомії і судової медицини ДЗ «ДМА МОЗ України», к.м.н., доцент



О.А. Алексєнко

ДОДАТОК А10

ЗАТВЕРДЖУЮ

Начальник КЗ «Дніпропетровське
обласне патологоанатомічне бюро» ДОР
Б.Ю. Корнілов

2019 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція для впровадження:** методика визначення імуногістохімічного профілю канцероматозу черевної порожнини у жінок з метою верифікації можливого дисемінованого раку яєчників та її практична цінність.

2. **Установа-розробник:** Державний заклад «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», 49044, Україна, м. Дніпро, вул. В. Вернадського 9. Автори: О.В. Пославська, І.С. Шпоцька, О.А. Савченко, М.Ю. Петрова.

Джерело інформації: ГОЛЬОВАНИЙ КАНЦЕРОМАТОЗ ЧЕРЕВНОЇ ПОРОЖНИНИ У ЖІНОК: ОСОБЛИВОСТІ ІМУНОФЕНОТИПІВ ТА МОРФОМЕТРИЧНИХ ПОКАЗНИКІВ / О.В. Пославська, І.С. Шпоцька, О.А. Савченко, М.Ю. Петрова // Медичні перспективи. – 2018. – Т. XXIII, № 3. – С. 27-35.

3. **Впроваджено:** в відділенні загальної патології КЗ «Дніпропетровське обласне патологоанатомічне бюро» ДОР.

4. **Строки впровадження:** 01.12.2018-01.02.2019 рр.

5. **Загальна кількість спостережень:** 70.

6. **Ефективність впровадження у відповідності з критеріями, викладеними в джерелі інформації (п.3)** - запропоновані критерії ефективні

№	Показники ефективності	За даними	
		розробника	організації, що впроваджує
1.	Підвищення рівня ранньої та своєчасної діагностики епітеліальних пухлин яєчників, (%)	70	75
2.	Підвищення рівня морфологічної верифікації канцероматозу черевної порожнини у жінок без первинної локалізації, (%)	55	60

8. **Зауваження, пропозиції:** немає.

Відповідальний за впровадження
зав. відділення загальної патології ДОНАБ,
к.мед.н., доц.



П.О. Грищенко

_____ 2019 р.

ДОДАТОК А11

ЗАТВЕРДЖУЮ

Начальник КЗ «Дніпропетровське
обласне патологоанатомічне бюро» ДОР
Б.Ю. Корнізов

_____ 2019 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Пропозиція для впровадження: методика визначення імуногістохімічного профілю ізольованих метастазів в пахвові лімфатичні вузли у жінок з метою верифікації можливого дисемінованого раку молочної залози та її практична цінність.

2. Установа-розробник: Державний заклад «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», 49044, Україна, м. Дніпро, вул. В. Вернадського 9. Автори: О.В. Пославська, І.С. Шпонька, П.О. Гринченко, П.В. Савченко.

Джерело інформації: Карциноми невідомої первинної локалізації з ізольованим одностороннім ураженням пахвових лімфатичних вузлів у жінок / О.В. Пославська, І.С. Шпонька, П.О. Гринченко, П.В. Савченко // Морфологія. – 2018. – Т. 12, № 3. – С. 127-132.

3. Впроваджено: в відділенні загальної патології КЗ «Дніпропетровське обласне патологоанатомічне бюро» ДОР.

4. Строки впровадження: 01.12.2018-01.02.2019 рр.

5. Загальна кількість спостережень: 78.

6. Ефективність впровадження у відповідності з критеріями, викладеними в джерелі інформації (п.3) - запропоновані критерії ефективні

№	Показники ефективності	За даними	
		розробників	організації, що впроваджує
1.	Підвищення рівня ранньої та своєчасної діагностики епітеліальних пухлин молочної залози, (%)	65	70
2.	Підвищення рівня морфологічної верифікації ізольованих метастазів в пахвові лімфатичні вузли у жінок, (%)	45	50

8> Зауваження, пропозиції: немає.

Відповідальний за впровадження
зав. відділення загальної патології ДОНАБ,
к.мед.н., доц.



П.О. Гринченко

«01» 02 _____ 2019 р.

ДОДАТОК А12

ЗАТВЕРДЖУЮ


Проректор з наукової роботи
Харківського національного
медичного університету
проф. В.В. М'ясоєдов
« 10 » 12 20 19 р.

АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Найменування пропозиції (метод профілактики, діагностики, лікування, пристрій, форма організаційної роботи та ін.): Спосіб діагностики пухлини невідомої первинної локалізації, заснований на визначенні комплексу імуногістохімічних властивостей та морфометричних показників клітини досліджуваних метастазів.
2. Ким і коли запропонований: к.м.н., доцент кафедри патологічної анатомії і судової медицини ДЗ «ДМА МОЗ України» Пославська О.В., перший проректор ДЗ «ДМА МОЗ України», д.мед.н., професор кафедри патологічної анатомії і судової медицини Шпонька І.С. (ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», 49044, м. Дніпро, вул. В. Вернадського, 9).
3. Джерело інформації (методичні рекомендації, інформаційний лист, звіт про НДР, дисертація, монографія, з'їзди, конференції, семінари та ін.):
 - Пославська О.В. Визначення лінійних розмірів та площ окремих морфологічних об'єктів на мікрофотографіях за допомогою програми IMAGEJ / О.В. Пославська // Морфологія. – 2016. – Т. 10, №3. – С. 377–381.
 - Морфометричний аналіз «панцитогератин-позитивних» непластичних уражень лімфатичних вузлів ший / О.В. Пославська, І.С. Шпонька, П.О. Гринько, О.А. Алексєнко // Патологія. – 2017. – Т.14, №3. – С. 287–292.
 - Пославська О.В. Плоскоклітинний рак невідомої первинної локалізації: ізольоване ураження лімфатичних вузлів ший / О.В. Пославська, І.С. Шпонька // Медичні перспективи. – 2018. – Т. XXIII, №2. – С. 13–20.
4. Де і коли впроваджено: кафедра патологічної анатомії Харківського національного медичного університету, 2019 р.
5. Результати застосування методу за період з 01.05.2019 р.–30.09.2019 р.: Впровадження у навчальний процес на кафедрі патологічної анатомії Харківського національного медичного університету в лекційному курсі, при проведенні практичних занять зі студентами, лікарями-інтернами, клінічними ординаторами та аспірантами, а також у науково-дослідну роботу кафедри.
6. Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелі інформації (п. 3): Використання результатів роботи в навчальному процесі та науково-дослідній роботі дозволяє поглибити знання студентів, лікарів-інтернів, клінічних ординаторів і аспірантів щодо вдосконалення діагностики пухлини невідомої первинної локалізації.
7. Зауваження, пропозиції: немає.

Відповідальний(і) за впровадження

в.о. завідувача кафедри
патологічної анатомії ХНМУ

10.12.2019
(дата)

проф. І.В. Сорокіна


(підпис)

ДОДАТОК А13



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиції для впровадження:** спосіб діагностики пухлин невідомої первинної локалізації, заснований на визначенні комплексу імуногістохімічних властивостей та морфометричних показників клітин досліджуваних метастазів.
2. **Установа розробника:** державний заклад «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», 49044, м. Дніпро, вул. В.Вернадського, буд. 9; автори: к.м.н. доцент кафедри патологічної анатомії і судової медицини ДЗ «ДМА МОЗ України» Пославська О.В., перший проректор ДЗ «ДМА МОЗ України», д.мед.н., професор кафедри патологічної анатомії і судової медицини Шпонька І.С.
3. **Джерела інформації:**

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

Морфометричний аналіз «панінеоцератин-позитивних» непластичних уражень лімфатичних вузлів ший / О.В. Пославська, І.С. Шпонька, П.О. Гриценко, О.А. Алексєнко // Патологія. – 2017. – Т.14. – №3. – С. 287-292.

Пославська О.В. Плоскоклітинний рак невідомої первинної локалізації: іольоване ураження лімфатичних вузлів ший / О.В. Пославська, І.С. Шпонька // Медичні перспективи. – 2018. – Т. XXIII. – №2. – С. 13-20.

4. **Впроваджено:** в патологоанатомічному відділенні Комунального закладу «Міської клінічної лікарні №4» Дніпровської міської ради.
5. **Строки впровадження:** 01.08.2019-01.10.2019 р.
6. **Ефективність впровадження у відповідності з критеріями, викладеними в джерелі інформації (п.3)**

Показники	За даними	
	Розробників	Впроваджуючої установи
Зменшення кількості карцином з невизначеною локалізацією, на %	83,5%	83,5%

7. **Зауваження, додатки:** не вносились.

Відповідальний за впровадження,
зав. патологоанатомічним відділенням

І.В. Кузнецький

« 1 » 10 2019 р.

ДОДАТОК А14

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Начальник КЗ «Одеське обласне патологоанатомічне бюро»

В.П. Бурлаченко
2019 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

- Пропозиції для впровадження:** спосіб діагностики пухлики невідомої первинної локалізації, заснований на визначенні комплексу імуногістохімічних властивостей та морфометричних показників клітин досліджуваних метастазів.
- Установа розробника:** державний заклад «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», 49044, м. Дніпро, вул. В.Вернадського, буд. 9; автори: к.м.н. доцент кафедри патологічної анатомії і судової медицини ДЗ «ДМА МОЗ України» Пославська О.В., перший проректор ДЗ «ДМА МОЗ України», д.мед.н., професор кафедри патологічної анатомії і судової медицини Шпотька І.С.
- Джерела інформації:**
Пославська О.В. Визначення лінійних розмірів та площ окремих морфологічних об'єктів на мікрофотографіях за допомогою програми ImageJ / О.В. Пославська // Морфологія. – 2016. – Т.10. – №3. – С. 377-381.
Морфометричний аналіз «панцитомеретри-позитивних» непластичних уражень лімфатичних вузлів ший / О.В. Пославська, І.С. Шпотька, П.О. Грищенко, О.А. Алкостенко // Патологія. – 2017. – Т.14. – №3. – С. 287-292.
- Пославська О.В. Плоскоклітинний рак невідомої первинної локалізації: гольоване ураження лімфатичних вузлів ший / О.В. Пославська, І.С. Шпотька // Медичні перспективи. – 2018. – Т. XXIII. – №2. – С. 13-20.
- Впроваджено:** в патологоанатомічному відділенні Одеського обласного патологоанатомічного бюро.
- Строки впровадження:** 01.08.2019-01.11.2019 р.
- Ефективність впровадження у відповідності з критеріями, викладеними в джерелі інформації (п.3)**

Показники	За даними	
	Розробників	Впроваджуючої установи
Зменшення кількості карцином з невизначеною локалізацією, на %	85,5%	83,5%

8. **Зауваження, додатки:** не вносились.Відповідальний за впровадження,
Ів. Суворовським ПАВ

І.М. Матвонина

«05» жовтня 2019 р.

ДОДАТОК Б
СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ АВТОРОМ ПРАЦЬ НА ТЕМУ
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 дослідження 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» неопластичних 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 цифрової МФМ й статистична обробка результатів)*.

9. Морфометричний аналіз «панцитокератин-негативних» неопластичних 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 цифрової 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 цифрової 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 ІГХ, цифрової МФМ 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, цифрової морфометрії й статистична обробка результатів)*.

13. Ізольований канцероматоз черевної порожнини у жінок: особливості імунотипів 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, цифрової морфометрії 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, проведення ІГХ, цифрової морфометрії 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^{INK} 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 інтерпретація 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 та дизайн 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, відбір та аналіз архівного матеріалу, проведення ІГХ, цифрової морфометрії, 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, статистичний аналіз 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.- практи. 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, статистичний аналіз 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 та дизайн дослідження, статистичний аналіз 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, проведення ІГХ, МФМ, статистичний аналіз даних)*.

29. Savchenko O., Poslavska O., Savchenko P. Carcinose papillaire abdominale 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, систематизація архівного матеріалу, проведення ІГХ, МФМ, 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, статистична обробка результатів)*.

31. Пославська О. В., Савченко П. В. Особливості карцином невідомої первинної локалізації з ізольованим одностороннім ураженням пахвових лімфатичних вузлів у жінок. *Сьогodenня біологічної науки: II Міжнародна наукова конференція (м. Суми, 9-10 листопада 2018 р.)*. Суми, 2018. С. 229-232. *(Дисертанту належить ідея та дизайн дослідження, систематизація архівного матеріалу, проведення ІГХ, МФМ, 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 2018 р.)*. Полтава, 2018. С. 37-38. *(Дисертанту належить ідея та дизайн дослідження, систематизація архівного матеріалу, проведення ІГХ та МФМ, статистична обробка результатів)*

33. Пославська О. В. Ізольовані метастази кісток у чоловіків із підвищенням сироваткового маркера 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 2018) 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`etude 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, 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 практи-*

ка 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, 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).*

ДОДАТОК В

ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Міжнародна науково-практична конференція студентів та молодих вчених «*Актуальні питання теоретичної та практичної медицини*» (м. Суми, 16-18 квітня 2014 р.) – публікація тез, усна доповідь.
2. Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених та студентів «*Здобутки теоретичної медицини - в практику охорони здоров'я*» (м. Запоріжжя, 24-25 березня 2016 р.) – публікація тез, усна доповідь.
3. Науково-практична конференція з міжнародною участю, присвячена 150-річчю з дня народження Д. К. Заболотного «*Сучасні теоретичні та практичні аспекти клінічної медицини*» (м. Одеса, 21-22 квітня 2016 р.) – публікація тез, усна доповідь.
4. XX Міжнародний медичний конгрес студентів та молодих вчених «*Сучасні погляди на актуальні питання теоретичної, експериментальної та практичної медицини*» (м. Тернопіль, 25-27 квітня 2016 р.) – публікація тез, усна доповідь.
5. XVI Міжнародна конференція студентів та молодих учених. «*Новини і перспективи медичної науки* – публікація тез, усна доповідь.
6. Всеукраїнська наукова конференція «*Актуальні питання біології та медицини*» (м. Суми, 16-17 листопада 2017 р.) – публікація тез, усна доповідь).
7. 2 Colloque international francophone et Ukraine «*Langues, Sciences et Pratiques*» (Dnipro, 3-4 octobre, 2018) – публікація тез, усна доповідь.
8. Друга всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «*Теорія та практика сучасної морфології*» (м. Дніпро, 10-12 жовтня 2018 р.) – публікація тез, усна доповідь.
9. II Міжнародна наукова конференція «*Сьогодення біологічної науки*» (м. Суми, 9-10 листопада 2018 р.) – публікація тез, усна доповідь.

10. Всеукраїнська науково-практична конференція молодих учених «*Медична наука в практику охорони здоров'я*» (м. Полтава, 16 листопада 2018 р.) – публікація тез, усна доповідь.
11. X Конгрес Асоціації патологів України «Перспективи розвитку сучасної патології» (Івано-Франківськ, 2018) – усна доповідь.
12. III International scientific and practical conference “*Scientific Research Priorities: theoretical and practical value*” (Nowy Sacz, Poland, 27-30 November 2018) – публікація тез, усна доповідь.
13. Науково-практична конференція молодих вчених «*Фундаментальна медицина: інтегральні підходи до терапії хворих з онкологією*» (м. Київ, 4-5 лютого 2019 р.) – публікація тез, усна доповідь.
14. Міжнародна науково-практична конференція «*Сучасна патоморфологічна діагностика в клінічній практиці лікаря*» (м. Вінниця, 10-11 квітня 2019) – публікація тез, усна доповідь.
15. 3 Colloque international francophone en Ukraine «*Langues, Sciences et Pratiques*» (Odessa, 3-4 Octobre, 2019) – публікація тез, усна доповідь.
16. Третя всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «*Теорія та практика сучасної морфології*» (м. Дніпро, 9-11 жовтня 2019 р.). – публікація тез, усна доповідь.