

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования «Московский государственный медико-  
стоматологический университет имени А.И. Евдокимова»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

*На правах рукописи*

**ГОКАДЗЕ НАДЕЖДА НЕСТОРОВНА**

**ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ МАРКЕРОВ p53, p16, WT1  
В АСПИРАЦИОННОМ МАТЕРИАЛЕ ИЗ ПОЛОСТИ МАТКИ  
У БОЛЬНЫХ СЕРОЗНЫМ РАКОМ ЯИЧНИКОВ**

14.01.12 – Онкология

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, профессор  
Жордания Кирилл Иосифович

Москва – 2021

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ.....</b>	<b>4</b>
<b>Глава 1. Обзор литературы .....</b>	<b>17</b>
1.1. Эпидемиология и статистика заболеваемости больных раком яичников .....	17
1.2. Исторические взгляды на гистогенез злокачественных опухолей яичников .....	20
1.3. Морфологическая классификация и современная концепция развития серозного рака яичников .....	27
1.4. Традиционные методы лабораторной и инструментальной диагностики рака яичников .....	37
1.5. Клеточные маркеры в морфологической диагностике серозного рака яичников .....	41
1.5.1. Экспрессия маркера p53 .....	41
1.5.2. Экспрессия маркера p16 .....	43
1.5.3. Экспрессия маркера WT1 .....	46
1.6. Роль цитологического и иммуноцитохимического исследований в диагностике серозных карцином яичников .....	48
1.7. Анализ содержимого полости матки в диагностике серозного рака яичников .....	50
<b>ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....</b>	<b>53</b>
2.1. Дизайн исследования .....	53
2.2. Клиническая характеристика исследуемых больных .....	56
2.3. Методика аспирации содержимого из полости матки .....	60

2.4. Алгоритм определения экспрессии маркеров p53, p16, WT1 в аспирационном материале из полости матки.....	62
2.5. Характеристика методов статистической обработки.....	63
<b>ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....</b>	<b>66</b>
3.1. Результаты цитологического и иммуноцитохимического исследования аспирационного материала больных серозным раком яичников .....	66
3.2. Результаты цитологического и иммуноцитохимического исследования аспирационного материала больных с метастатическим поражением яичников, доброкачественными опухолями яичников и испытуемых контрольной группы .....	70
3.3. Анализ показателей диагностической информативности цитологического и иммуноцитохимического исследования маркеров p53, p16, WT1 и их комбинации в аспирационном материале из полости матки больных серозным раком яичников.....	72
3.3.1. Анализ показателей диагностической информативности цитологического метода исследования.....	72
3.3.2. Анализ результатов иммуноцитохимического метода исследования аспирационного материала из полости матки в диагностике серозных карцином яичников.....	73
3.4. Анализ диагностической информативности иммуноцитохимического исследования маркеров p53, p16, WT1 в аспирационном материале из полости матки в дифференциальной диагностике опухолей яичников .....	79
3.5. Описание клинических наблюдений.....	81
<b>Заключение.....</b>	<b>90</b>
<b>Выводы.....</b>	<b>98</b>
<b>Список условных сокращений .....</b>	<b>99</b>
<b>Список использованной литературы.....</b>	<b>100</b>

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы

Рак яичников (РЯ) — группа морфологически гетерогенных злокачественных опухолей, наибольшая часть из которых (80-85%) представлена серозными формами. Отсутствие ранней клинической симптоматики и, как следствие, поздняя диагностика заболевания, приводящая в свою очередь к неудовлетворительным результатам лечения, — очевидные причины неблагоприятного прогноза и высокой смертности больных РЯ [29].

В структуре общей заболеваемости злокачественными новообразованиями (ЗНО) в РФ за 2018 год РЯ занимает 9-е место, составляя около 11 наблюдений на 100 тыс. населения женского пола [10]. В структуре ЗНО женской репродуктивной системы РЯ занимает 4-ю позицию, немногим уступая раку молочной железы, шейки матки и эндометрия. Согласно данным отечественной статистики за 2019 год [10] в РФ всего на учете по РЯ состоит 115 556 женщин, из них с впервые установленным диагнозом — 12 466 пациенток; летальность на 1-м году жизни с момента установления диагноза составляет 19,4%, что в свою очередь свидетельствует о том, что в течение 1-го года после установления диагноза погибает каждая 5-я больная.

Рассматривая показатели диагностики РЯ за 2019 год, обращает на себя внимание тот факт, что в 60% наблюдений диагноз устанавливается на III–IV стадиях заболевания. По данным отечественной статистики радикальное лечение 2019 году выполнено только 50% пациенток от общего количества взятых на учет, еще 20% от этого числа лечение продолжено в 2020 году. Таким образом, около 30% пациенток радикальное лечение не проводилось, очевидно именно по причине запущенности опухолевого процесса [10].

В целом, анализируя динамику показателей заболеваемости в РФ с 2008 по 2018 годы, следует отметить высокий уровень прироста, который за указанный период составил 10,19%, при среднегодовом приросте, равном 0,97% [10].

Смертность от РЯ в РФ продолжает занимать лидирующие позиции, несмотря на некоторую тенденцию к снижению с 2008 по 2018 годы, — 13,84%. В общей структуре смертности РЯ занимает 8-е место, а в структуре смертности женского населения от ЗНО репродуктивной системы — 2-е. При этом абсолютное число женщин погибших от РЯ в 2018 году составило 7463, что в свою очередь составляет 5,5% от общего числа женщин, погибших от ЗНО. Стандартизированный показатель смертности к 2019 году составил 4,92 на 100 тыс. женского населения, несколько снижаясь по сравнению с 2008 годом, когда значение его составляло 5,5 на 100 тыс. женщин [10].

Столь неблагоприятные показатели свидетельствуют о том, что выявление РЯ на ранних стадиях остается одной из ключевых проблем своевременного лечения пациенток с РЯ. Недостаточное понимание этиологии и патогенеза РЯ является причиной отсутствия скрининговых методов ранней диагностики, а существующие методы обнаружения РЯ, характеризуются низкой чувствительностью и специфичностью. Рутинное определение сывороточных уровней СА-125 и НЕ4 в комбинации с ультразвуковым исследованием (УЗИ) органов малого таза остаются единственными в диагностике опухолей яичников, однако в реальной клинической практике не дают исчерпывающую информацию о характере опухолевого процесса [22; 67; 83; 85]. Все это подчеркивает необходимость более детального изучения патогенеза РЯ.

Общепринятые теории овариального канцерогенеза, такие как овуляторная теория (Fathalla M.F., 1971), гонадотропиновая гипотеза, гипотеза гормональной стимуляции и воспалительная теории, не способны полноценно объяснить механизмы развития РЯ [35; 54; 89; 99].

Отсутствие убедительных данных о предраковом поражении самого яичника, доказанный профилактический эффект билатеральной сальпингэктомии и гистерэктомии позволяет рассматривать матку и фаллопиевы трубы одними из потенциальных источников РЯ и рака брюшины. Гистологические и иммуноморфологические характеристики карциномы яичников

продемонстрировали сходство с внеяичниковыми тканями, происходящими из клеток Мюллера (парамезонефрального) протока, известного как источника развития эпителия верхней трети влагалища, матки и фаллопиевых труб [72; 94].

Гипотезы экстраовариального происхождения РЯ рассматривают в качестве источника болезни не яичник и покрывающий его мезотелий брюшины, а эпителий фимбриального отдела маточной трубы и эндометрий, которые в свою очередь дают начало серозной интраэпителиальной карциноме маточной трубы (СТИК) и неинвазивной интраэпителиальной эндометриальной карциноме (ИЭК) [64; 70; 96; 109]. В работе R.A. Ambros et al. (1995) было продемонстрировано, что ИЭК является фоновым заболеванием при развитии серозной папиллярной карциномы эндометрия (СПКЭ) — агрессивной формы карциномы эндометрия с неблагоприятным прогнозом, морфологически схожей с серозной папиллярной карциномой яичников и раком фаллопиевых труб [18]. Несколькими годами ранее, S.C. Lauchlan (1981) первым описал подтип карциномы эндометрия, имеющей морфологическое сходство с серозной карциномой маточной трубы и яичников. В представленных S.C. Lauchlan наблюдениях пациентки погибали от прогрессирования заболевания, проявлявшегося в виде диссеминации опухоли в брюшной полости на фоне минимальной инвазии в миометрий или даже при полном ее отсутствии [55]. ИЭК в полости матки зачастую мультифокальна и часто обнаруживается на поверхности яичников и фаллопиевых труб. Аналогично известной теории развития эндометриоза, автором которой является J.A. Sampson (1927) [97], черзтрубная ретроперистальтическая миграция клеток из источника ИЭК может стать источником серозной карциномы любого отдела брюшной полости [90]. Слабые межклеточные связи в первичном очаге обуславливают беспрепятственную миграцию в брюшную полость и имплантацию на перитонеальную поверхность. Так же, как эндометриоз, большинство интраперитонеальных карцином развиваются на поверхности и вблизи яичников. Имплантация предраковых клеток в фаллопиевых трубах может объяснить предраковые поражения фимбриальных отделов маточных труб, обнаруженные в

исследовании L. Massuger [64]. Теоретические выкладки о том, что эндометрий может являться одним из источников РЯ, подтверждаются на практике высоким профилактическим эффектом в отношении злокачественных новообразования яичников, которым обладают перевязка маточных труб и гистерэктомия, а также физиологические процессы (беременность, лактация) и гормональная терапия, сопровождающаяся подавлением овуляции.

В ряде исследований по изучению иммуноморфологического профиля серозных карцином различных локализаций (Nofech-Mozes S., 2008; Dabbs D.J., 2017) было показано, что для серозных карцином эндометрия не свойственна экспрессия WT1 в отличие от серозных карцином яичников, при которых практически всегда прослеживается ядерная экспрессия этого маркера [32; 78], в виду чего мы сочли целесообразным оценить в диссертационном исследовании экспрессию WT1 в образцах клеточного содержимого из полости матки у пациенток с серозным РЯ.

Сторонники трубного происхождения серозного РЯ (Piek J.M.etal., 1995; Finch A.etal., 2006; Medeiros F.etal., 2012; Zheng W.etal., 2012) полагают, что источником серозных карцином яичников является эпителий фимбриального отдела маточной трубы, который в ряде случаев может служить как источником формирования инклюзионных кист на поверхности яичника, из которых в последующем развиваются доброкачественные, пограничные, а затем и опухоли низкой степени злокачественности (low-grade, LGOSC), так и местом формирования серозной трубной интраэпителиальной карциномы маточной трубы, являющейся предшественником серозных опухолей высокой степени злокачественности (high-grade, HGOSC) [30; 65; 84; 126].

Исследуя морфологические, иммуногистохимические и молекулярные характеристики серозных опухолей яичников, R.JKurmani I.-M. Shih (2010) разработали классификацию СКЯ, согласно которой выделили два типа серозного РЯ [52].

Опухоли I типа — группа карцином низкой степени злокачественности (low-grade/LGSC), включающая в себя опухоли, в основе канцерогенеза которых, как правило, лежат мутации генов *PIK3CA*, *K-ras*, *B-raf*, *PTEN*, *CTNNB1*, *PIN3CA*, *ARID1a*, *PPP2R1A*. Эта группа опухолей характеризуется более длительным индолентным клиническим течением, поэтапным развитием из доброкачественных кистаденом через формирование пограничных, а затем, по мере накопления мутаций, и злокачественных опухолей. В 1996 году R.T. Vurks et al. описали подгруппу атипичных неинвазивных пролиферирующих серозных опухолей яичников и микропапиллярную серозную карциному, которые были объединены в категорию «пограничных». Нескольким позже было установлено, что именно эти изменения являются фоновой патологией карцином с низким злокачественным потенциалом (low-grade) [27]. Для LGSC диагноз чаще устанавливается на более ранних стадиях и для них характерен более благоприятный прогноз.

Опухоли II типа, или карциномы высокой степени злокачественности (high-grade/HGSC), составляют наибольшее число наблюдений серозного рака, а именно до 75%, являясь наиболее частой причиной смерти в группе пациенток со злокачественными опухолями яичников. Серозные карциномы яичников (СКЯ) II типа развиваются «*de novo*», и для молекулярно-генетического профиля этих опухолей наиболее характерны мутации генов *TP53*, *BRCA-1*, *BRCA-2*, *Bcl-2*, *HLA-G*, *HER2 neu*, *C-kit* и др. Клиническое течение HGSC более агрессивное по сравнению с LGSC, в большинстве случаев диагноз устанавливается на диссеминированных стадиях болезни. Источником формирования этого типа опухолей, как отмечено ранее, является серозная трубная интраэпителиальная карцинома (СТИК) — очаги малигнизированного трубного эпителия, в большинстве случаев возникшего в результате нарушения функции гена-супрессора опухолевого роста *TP53*. Патогенез СТИК носит ступенчатый характер и включает в себя несколько последовательных этапов: трансформацию клеток нормального эпителия маточной трубы в *p53-signature* через мутацию гена *TP53* с



последующим развитием серозного трубного интраэпителиального поражения (СТИП) и СТИК, которые, сливаясь, приобретают способность мигрировать как в полость матки, так и в брюшную полость, являясь в этих анатомических зонах потенциальным источником серозного рака. Последующие исследования молекулярно-генетического профиля СКЯ позволили установить выраженные различия между low-grade и high-grade опухолями: мутация гена *TP53* и следующая из этого ядерная экспрессия белка p53 прослеживалась в 98% наблюдений high-grade опухолей в отличие от low-grade, при которых наиболее характерной является мутация гена *K-ras* [107; 117]. Данный факт нашел свое клиническое отражение в клинической практике и дифференциальной диагностике СКЯ: на сегодняшний день ведущую роль в морфологической верификации обоих типов СКЯ играет иммуногистохимическая оценка экспрессии характерных маркеров среди которых наиболее значимы p53, p16, WT1 [98].

В свете дуалистической модели, согласно которой СКЯ обоих типов имеют экстраовариальное происхождение, нами было выдвинуто предположение, что исследование клеточного состава содержимого полости матки может иметь ключевое значение в диагностике серозных карцином.

Цитологический и иммуноцитохимический (ИЦХ) методы диагностики РЯ в выпотных жидкостях, полученных как на догоспитальном этапе, так и во время хирургического этапа лечения, продолжает активно использоваться для морфологической верификации диагноза. Ранее образец содержимого из полости матки, как правило, получали аспирационным методом с применением маточного зонда типа Пайпель, а последующее цитологическое исследование материала позволяло уточнить морфологию клеток. Однако, на наш взгляд, данный метод имеет ряд существенных недостатков: полученный материал чаще всего содержал большое количество форменных элементов крови и клеток эндометрия, что значительно затрудняло поиск атипичных клеток методом простого цитологического исследования. Кроме того, процедура в большинстве случаев достаточно болезненна. Нами было сделано предположение, что методика

аспирации содержимого из полости матки с помощью применения гибкого двухпросветного центрального венозного катетера REFCV-17702-E фирмы Arrow International Inc. (США) и цитологическое исследование материала с применением жидкостной цитологии системы Cytospin с последующим ИЦХ исследованием с применением автоматизированной системы BenchMark ULTRA (иммуногистостейнер Ventana) может повысить эффективность возможности диагностики серозного РЯ [6–8; 11; 12].

### **Степень разработанности темы**

Первые работы по изучению содержимого из полости матки в диагностике РЯ появились более 20 лет назад, но, тем не менее, к настоящему времени отсутствуют единые алгоритмы, сочетающие в себе как высокую диагностическую информативность, так и возможность их внедрения в клиническую практику на уровне амбулаторно-поликлинического звена здравоохранения.

Несмотря на развитие генетики и молекулярной диагностики, в том числе ИЦХ метода, нерешенным остается вопрос поиска высокочувствительных и высокоспецифичных в отношении РЯ клеточных опухолевых маркеров, которые позволили бы если не установить диагноз на ранней стадии, то с наибольшей долей вероятности или подтвердить, или опровергнуть наличие болезни.

Большинство зарубежных работ по изучению смывов и аспириатов из полости матки основаны на использовании значительного количества разнообразных маркеров с применением полимеразной цепной реакции (ПЦР) и секвенирования генов — исследованиях, позволяющих идентифицировать конкретные гены и мутации, а также их комбинации, лежащие в основе овариального канцерогенеза. Однако эти методы доступны далеко не во всех медицинских учреждениях, что существенно затрудняет их широкое внедрение в повседневную практику.

В связи с тем, что эффективность лечения РЯ и выживаемость пациенток напрямую зависят от стадии, на которой был диагностирован опухолевый процесс, проблема поиска и разработки новых подходов к диагностике РЯ остается актуальной.

### **Цель исследования**

Повышение эффективности диагностики серозного рака яичников на основании иммуноцитохимического анализа аспирационного материала из полости матки.

### **Задачи исследования**

1. Оптимизировать методику аспирации содержимого полости матки у больных серозным раком яичников III–IV стадий.

2. Определить экспрессию маркеров p53, p16, WT1 в аспирационном материале из полости матки у пациенток с серозным раком яичников III–IV стадий, с доброкачественными опухолями яичников, метастатическим поражением яичников и практически здоровых женщин (контрольная группа).

3. Оценить диагностическую значимость маркеров p53, p16, WT1 в аспирационном материале из полости матки у больных серозным раком яичников III–IV стадии.

4. Оптимизировать алгоритм определения экспрессии маркеров p53, p16, WT1 в аспирационном материале из полости матки у больных серозным раком яичников III–IV стадий.

5. Оценить возможности применения ИЦХ метода исследования аспирационного материала из полости матки на маркеры p53, p16, WT1 в дифференциальной диагностике между серозным раком III–IV стадии, метастатическим поражением и доброкачественными опухолями яичников, а также между high и low-grade подтипами серозных карцином.

### **Научная новизна**

В рамках настоящей научной работы впервые оптимизирована методика аспирации содержимого полости матки в результате сбора биологического материала у больных исследуемых групп (больные серозным раком яичников III–IV стадий, доброкачественными опухолями яичников, метастатическим поражением яичников) и контрольной группы (здоровые женщины). Впервые материал исследован цитологическим методом, после чего в нем определена

экспрессия маркеров p53, p16, WT1 иммуноцитохимическим методом и оценена диагностическая значимость вышеперечисленных маркеров у больных исследуемых групп. В данной работе оптимизирован алгоритм определения экспрессии маркеров p53, p16, WT1 в аспирационном материале из полости матки для диагностики серозных карцином яичников III–IV стадий. Впервые в отечественной практике на большом клиническом материале разработан подход, на основании которого на этапе предоперационного обследования представляется возможным подтвердить диагноз рака, удостовериться в его серозном типе, а также судить о подтипе серозного рака (high- или low-grade) в каждом конкретном клиническом наблюдении.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Полученные результаты иллюстрируют важность изучения клеточных маркеров в диагностике серозного рака яичников, а также наиболее оптимального метода их оценки, который может быть широко внедрен в клиническую практику для определения гистологического подтипа опухоли и выбора наиболее рациональной тактики лечения этой категории больных.

В ходе данного диссертационного исследования разработан и усовершенствован современный подход к диагностике серозного рака яичников, основанный на иммуноцитохимическом исследовании экспрессии маркеров p53, p16, WT1 в аспирационном материале из полости матки, оценена возможность применения данного метода в дифференциальной диагностике опухолей яичников, в том числе и подтипов серозного рака (high- и low-grade) на основании оценки вышеперечисленных клеточных маркеров.

### **Методы и методология исследования**

Для решения поставленных целей и задач проведено проспективное исследование, на первом этапе которого обследовано 272 пациентки, обратившихся в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по поводу опухолей яичников в период с 2013 по

2019 годы. В сравнительном аспекте анализированы результаты исследований в 4 группах пациенток.

В группу I (основная) были включены: 71 пациентка с серозным раком яичников III–IV стадии, прошедшая на первом этапе хирургическое лечение. При анализе морфологического строения опухоли после проведенного хирургического лечения больные разделились следующим образом: подгруппа с серозными high-grade карциномами — 51 пациентка; low-grade карциномами — 20 пациенток.

В группу II вошли 50 пациенток с метастатическим поражением яичников из другого первичного очага. Из них: у 15 (30%) больных диагностирован рак молочной железы, у 9 (18%) рак толстой кишки, у 8 (16%) рак поджелудочной железы, у 6 (12%) рак желудка и у 2 (4%) рак почки.

Группу III составили 50 пациенток с доброкачественными опухолями яичников, из которых: 15 (30%) больных с серозными папиллярными цистаденомами, 13 (26%) муцинозными цистаденомами, 8 (16%) зрелыми тератомами, 8 (16%) текомаами, 6 (12%) - эндометриоидными цистаденомами.

В группу IV (контрольная) были включены 50 практически здоровых женщин-добровольцев, которым была выполнена диагностическая аспирация содержимого полости матки.

Критерии включения пациенток в исследование были следующими:

- возраст старше наступления менархе;
- наличие родов в анамнезе;
- наличие объемных (одно- или двусторонних) образований в области придатков матки по данным гинекологического осмотра и/или подтвержденного инструментальными методами обследования (УЗИ органов малого таза, КТ органов брюшной полости с контрастным усилением, МРТ органов малого таза с контрастным усилением);
- давшие согласие на исследование.

У всех пациенток с опухолями яичников диагноз заболевания был в дальнейшем подтвержден морфологически.

Критерии исключения пациентов из исследования были следующими:

- отсутствие возможности проведения хирургического лечения на 1-м этапе и морфологического подтверждения диагноза;
- обнаружение отличной от серозной (муцинозной, эндометриоидной, светлоклеточной) формы РЯ, неэпителиальных ЗНО придатков и/или рака шейки матки, а также рака эндометрия по результатам морфологического исследования операционного материала;
- неоадьювантная терапия по поводу РЯ в анамнезе;
- наличие в анамнезе экстирпации матки и/или без придатков, двусторонней аднексэктомии;
- атрезия цервикального канала.
- отказ пациентки от проведения аспирации содержимого полости матки.

Стадирование заболевания проводилось в соответствии с классификацией TNM 8-ое изд., FIGO от 2014 года [86].

Аспирация клеток из полости матки производилась с помощью двухканального силиконового катетера и физиологического раствора, для цитологического исследования полученного материала и проведения ИЦХ реакций заготовлены цитоспиновые многослойные препараты системы Cytospin — серия многослойных цитопрепаратов на центрифуге Cytospin — 3 препарата в режиме 1000 g/мин в течение 5 минут. Два мазка окрашивали по Лейшману, на 3-х проводили ИЦХ исследование с моноклональными антителами (МКАТ) к p53, p16, WT1. Остальные препараты (6–4) фиксировали в химически чистом ацетоне при температуре +4– +8 °С и архивировали при температуре –20 °С, предварительно завернув в фольгу. ИЦХ исследование проводили на иммуногистостейнере Ventana (BenchMark ULTRA). Для ИЦХ исследования были использованы МКАТ фирмы ДАКО: к p53 (клон DO-7, разведение 1:25 – 1:50), p16 (клон Е6Н4, разведение 1:25 – 1:50), WT1 (клон 6F-Н2, разведение 1:75 – 1:150).

Статистическая обработка результатов и построение диаграмм выполнена с помощью программного обеспечения MS Office Excel, STATISTICA 8 (StatSoftInc, США) и MedCalc для Windows, v. 15.1 (MedCalcSoftware, Бельгия).

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Установлена высокая специфичность иммуноцитохимического метода исследования экспрессии маркеров p53, p16 и WT1 (98%, 94%, 99% и 98%) в аспирационном материале из полости матки больных III–IV стадиями серозного рака яичников обоих гистологических подтипов (high-grade, low-grade) при невысокой чувствительности и их комбинации (47,8%, 38%, 52,1% и 63,4%), что позволяет использовать метод в качестве дополнительного, но не в качестве скрининга.

2. Показатели диагностической информативности комбинации маркеров p53, p16, WT1 и их комбинации превышают таковые, чем каждого маркера в частности.

3. Оценка экспрессии маркеров p53, p16, WT1 и их комбинации в аспирационном материале из полости матки иммуноцитохимическим методом может быть использована в качестве вспомогательного метода для проведения дифференциальной диагностики между high- и low-grade серозными карциномами яичников на этапе планирования лечения.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Представленные в диссертационной работе теоретические положения, методологические подходы и выводы являются результатом проработки самостоятельного научного исследования. Объем материала, период наблюдения, применение современных методов исследования и статистического анализа свидетельствуют о достоверности полученных результатов, сформулированных выводов.

Основные положения диссертации представлены:

- на IV Всероссийской Конференции по молекулярной онкологии (Москва, 17–19 декабря 2018 года);
- на XIII Международном конгрессе по репродуктивной медицине ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (Москва, 21–23 января 2019 года);
- на ежегодном съезде Международного Сообщества Гинекологической Онкологии 2020 года (International Gynecologic Cancer Society 2020 Annual Global Meeting, September 10-13).

Основные положения используются в практической работе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, а также используются в процессе лекционного и практического обучения кафедры онкологии ФДПО ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России.



## ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

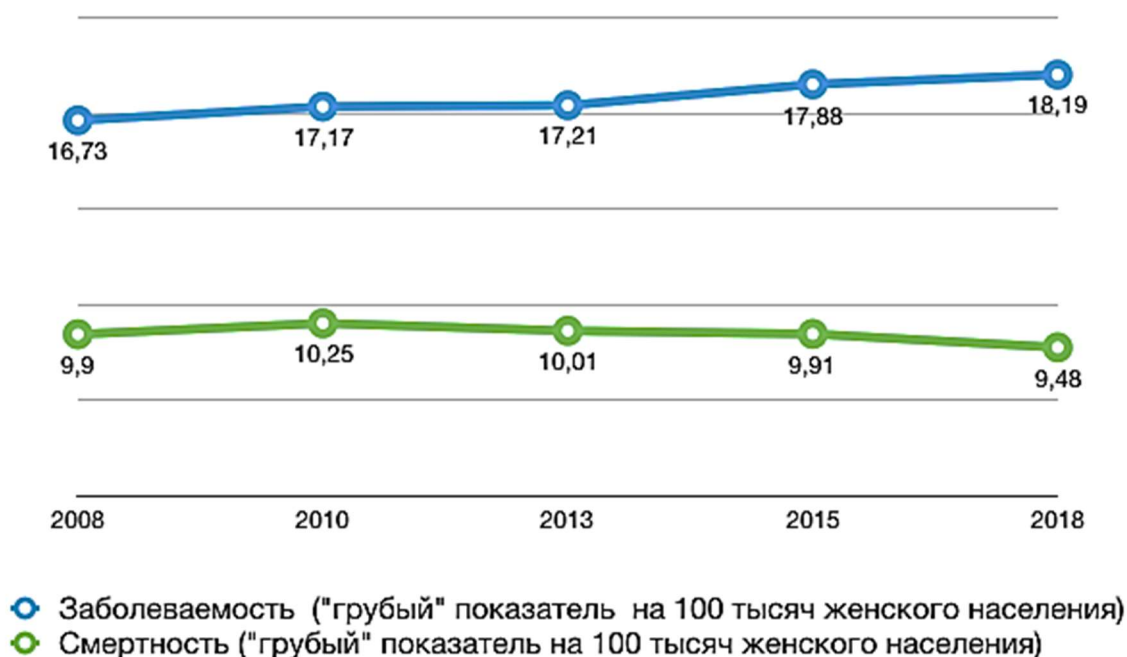
### 1.1 Эпидемиология и статистика заболеваемости больных раком яичников

РЯ — группа гетерогенных по морфологической структуре злокачественных заболеваний, которая продолжает оставаться одной из наиболее прогностически неблагоприятных среди всей онкологической патологии. Согласно Всемирной базе данных GLOBOCAN число заболевших РЯ женщин в 2018 году по всему миру составило 295 414, погибших — 184 799 [24]. Среднее значение показателя заболеваемости РЯ в мире к 2018 году составило 6,6 наблюдений на 100 тыс. женского населения. Наиболее высокие цифры этого показателя отмечены в странах Центральной, Западной и Северной Европы — в Сербии, Беларуси, Польше, Латвии, Украине и Литве этот показатель колеблется от 12,2 до 16,6 на 100 тыс. женщин, а также в странах Северной Америки — 8,6 на 100 тыс. женщин. По данным American Cancer Society в 2018 году, в США зарегистрировано около 22 240 новых наблюдений РЯ и 14 070 смертей от него же [113].

РФ продолжает занимать одну из лидирующих позиций по заболеваемости РЯ, уровень которой, по данным GLOBOCAN, к 2018 году составил 11,1 наблюдения на 100 тыс. женщин [24]. В структуре общей заболеваемости ЗНО в РФ за 2018 год РЯ занимает 9-е место, составляя около 11 наблюдений на 100 тыс. населения женского пола [10]. В структуре ЗНО женской репродуктивной системы РЯ занимает 4-ю позицию, немногим уступая року молочной железы, шейки матки и раку эндометрия. Согласно данным отечественной статистики за 2019 год [10] в РФ всего на учете по РЯ состоит 115 556 женщин, из них с впервые установленным диагнозом — 12 466 пациенток; летальность на 1-м году жизни с момента установления диагноза составила 19,4%, что в свою очередь свидетельствует о том, что в течение 1-го года после установления диагноза погибает каждая 5-я больная.

Рассматривая показатели диагностики РЯ за 2019 год, обращает на себя внимание тот факт, что в 60% наблюдений диагноз установлен на III–IV стадиях заболевания. Радикальное лечение в 2019 году выполнено только половине пациенток от общего количества взятых на учет, еще 20% от этого числа

лечение продолжено в 2020 году. Таким образом, около 30% пациенток не подлежат радикальному лечению, очевидно, именно по причине запущенности опухолевого процесса [10]. В целом, анализируя динамику показателей заболеваемости с 2008 по 2018 годы, следует отметить высокий уровень прироста — 10,19% за указанный период (Рисунок 1) при среднегодовом приросте, равном 0,97% [10].



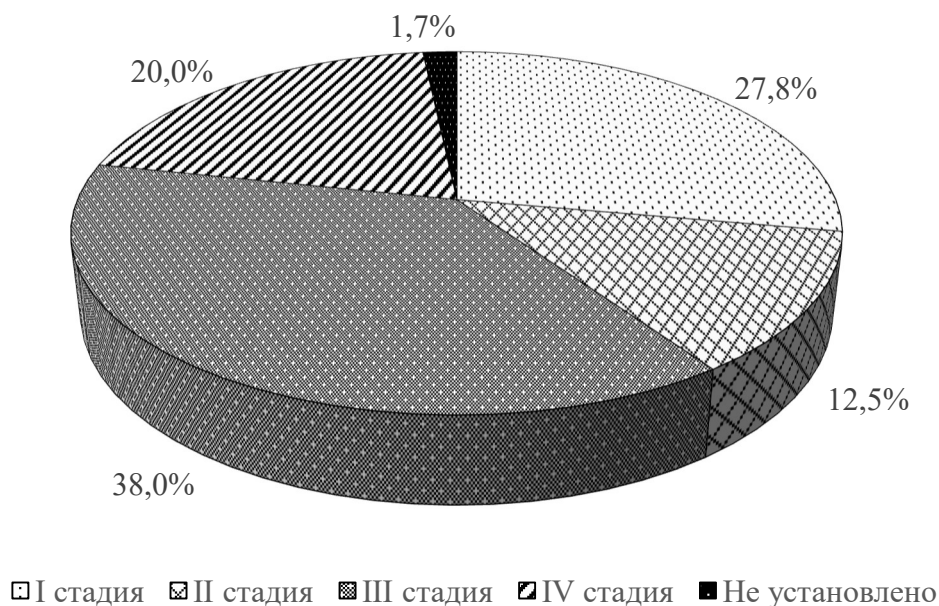
**Рисунок 1** — Динамика показателей заболеваемости и смертности от рака яичников среди женского населения России в 2008-2018 годах [10]

Смертность от РЯ продолжает занимать лидирующие позиции, несмотря на некоторую тенденцию к снижению с 2008 по 2018 годы — 13,84%. В общей структуре смертности РЯ занимает 8-е место, а в структуре смертности женского населения от ЗНО репродуктивной системы — 2-е. При этом, абсолютное число женщин погибших от РЯ в 2018 году — 7463, что в свою очередь составляет 5,5% от общего числа женщин, погибших от ЗНО. Стандартизированный показатель смертности к 2019 году составил 4,92 на 100 тыс. женского населения, несколько снижаясь по сравнению с 2008 годом, когда значение его составляло 5,5 на 100 тыс. женщин [10].

Стоит отметить, что до 20% случаев РЯ обусловлены наследственными генетическими мутациями (мутации генов *BRCA1*, *BRCA2*, синдром Линча, сайт-специфический семейный РЯ и др); соответственно, у остальных пациенток возникает спорадическое заболевание вследствие приобретенных мутаций. Согласно по данным статистики рак яичников редко выявляется у женщин моложе 30 лет. В 2018 году пик заболеваемости отмечен в группе больных в возрасте от 60 до 64 лет, достигая в этой возрастной категории 38,7 на 100 тыс. женщин в год («грубый» показатель). По данным отечественной статистики за 2018 г. средний возраст больных раком яичников составил 59,3 года, средний возраст умерших — 65,1 год, что немногим отличается от значений предыдущих лет [10].

Рассматривая показатели диагностики злокачественных новообразований, в РФ нельзя не отметить, что удельный вес лиц с опухолевым процессом I–II стадии от числа больных с впервые выявленным диагнозом среди больных РЯ за 2018 году равнялся 40,3%, тогда как диссеминированные формы были диагностированы почти у каждой 2-й пациентки (Рисунок 2) [10]. Исходя из этих данных логично утверждать, что одной из главных причин высокой смертности этой категории пациенток является поздняя диагностика заболевания и отсутствие эффективных методов диагностики болезни.

Анализ результатов лечения начальных и распространенных стадий РЯ, согласно которым 5-летняя выживаемость при I и II стадии находится на уровне 80%, в противоположность III и IV стадии, где этот показатель равен не более 30%, свидетельствуют в пользу необходимости разработки эффективных скрининговых программ. По сводным данным популяционных раковых регистров стран Европы, 1-летняя выживаемость больных РЯ составляет 63%, 3-летняя — 41%, 5-летняя — 35% [113].



**Рисунок 2** — Показатели диагностики РЯ в 2018 году: распределение больных по стадиям, на которых выявлено заболевание [10]

Несмотря на значительные усилия, направленные на развитие хирургических и лекарственных методов лечения, в том числе поддерживающей терапии, смертность от РЯ все еще остается высокой. На сегодняшний день, согласно данным отечественных эпидемиологов, летальность на 1-м году после установления диагноза составляет 21,2%, то есть каждая 5-я больная погибает в течение первого года после установления диагноза [10]. Общее число умерших от РЯ по прогнозам ВОЗ ежегодно будет увеличиваться: если в 2015 году в РФ этот показатель составил 7789 женщин, то по предварительным данным к 2035 году эта цифра возрастет до 8668 пациенток (на 11,13%). Принимая во внимание столь удручающие данные, становится очевидной необходимость поиска новых подходов к диагностике РЯ, а также детального изучения причин и патогенетических закономерностей развития болезни.

## **1.2 Исторические взгляды на гистогенез злокачественных опухолей яичников**

Недостаточное понимание этиологии и патогенеза рака яичников, несомненно, является главной причиной отсутствия скрининговых методов

диагностики. Общепринятые теории овариального канцерогенеза, такие как овуляторная теория, гонадотропиновая гипотеза, гипотеза гормональной стимуляции и воспалительная теории, неспособны полноценно объяснить механизмы развития РЯ [35; 54; 89; 99].

Согласно теории постоянной овуляции, выдвинутой M.F. Fathalla в 1971 году, ведущую роль в развитии рака яичников принадлежит постоянной овуляции: повреждение поверхностного эпителия яичника и последующие за этим повреждением пролиферативные процессы повышают риск малигнизации [35]. В поддержку этой теории свидетельствуют результаты популяционного исследования S. Trabert et al. (2020): риск РЯ снижается при уменьшении числа овуляторных циклов — при беременности, применении комбинированных оральных контрацептивов [114]. Однако, овуляторная теория не способна объяснить почему морфологическое строение клеток поверхностного эпителия яичника и клеток овариального рака столь разнятся. Кроме того, исходя из этой теории, логичным было бы предположить наличие истинно предракового поражения яичников, которое, насколько это известно на сегодняшний день, до сих пор не обнаружено.

В 1992 году A.S. Whittemore et al. выдвинули гонадотропиновую гипотезу [121], согласно которой, основным пусковым фактором овариального канцерогенеза является воздействие на поверхностный эпителий яичника гонадотропных гормонов гипофиза — фолликулостимулирующего (ФСГ) и лютеинизирующего (ЛГ). По их мнению, именно ФСГ и ЛГ стимулируют мутагенез, клеточное деление и рост опухоли посредством активации митоген-активируемой протеинкиназы, повышения экспрессии рецептора эпидермального фактора роста, (epidermal growth factor receptor, EGFR), рецептора типа 2 человеческого эпидермального фактора роста (human epidermal growth factor receptor 2, HER2). Кроме того, при воздействии ФСГ и ЛГ «*in vitro*» повышается экспрессия таких онкогенов, как  $\beta$ -катенин, циклин G2, инсулиноподобные факторы роста,  $\beta$  – интегрин . Статистические данные продемонстрировали, что

риск развития РЯ у бесплодных женщин, получавших препараты, стимулирующие овуляцию, выше в 2,8 раза, а риск развития пограничных опухолей в 4 раза выше по сравнению с бесплодными женщинами, не получавшими препараты для повышения фертильности [121]. Стоит отметить, что на сегодняшний день ни в одном исследовании не доказано прямое канцерогенное действие гонадотропинов, однако в экспериментах с трансплантацией опухолей животным гонадотропные препараты ускоряют рост опухоли и ангиогенез, усиливают экспрессию фактора роста эндотелия и адгезию клеток. Исходя из этого можно предположить, что гонадотропины стимулируют опухолевую прогрессию РЯ, но не являются пусковым фактором в патогенезе заболевания [28].

Согласно теории гормональной стимуляции, высокие концентрации андрогенов, например, при синдроме поликистозных яичников, стимулируют канцерогенез. Наиболее высокая стимуляция андрогенов создается внутри растущих фолликулов, которые через рецепторный аппарат поверхностного эпителия яичников усиливают пролиферацию клеток. В противоположность андрогенам, прогестерон и его производные, согласно эпидемиологическим данным, снижают риск развития РЯ [15].

Воспалительная теория, выдвинутая в 1999 году. R.V. Ness и C. Cottreau, гласит, что ведущая роль в канцерогенезе РЯ играет воспаление, которое сопровождает каждую овуляцию: генотоксические медиаторы воспаления воздействуют на окружающие ткани и приводят к их генетическим повреждениям и злокачественной трансформации клеток [76].

Таким образом, ни одна из вышеперечисленных теорий овариального канцерогенеза не может полноценно объяснить механизмы овариального канцерогенеза и найти свое отражение в клинической практике. Отсутствие предракового поражения яичника, профилактический эффект билатеральной сальпингэктомии и гистерэктомии свидетельствуют в пользу экстраовариального происхождения СКЯ и заставляют рассматривать матку и фаллопиевы трубы в качестве потенциальных источников рака брюшины и яичников. Кроме того,

гистологические и морфологические исследования ткани карциномы яичников продемонстрировали фенотипическое сходство с внеяичниковыми тканями, происходящими из клеток Мюллера протока, которым яичник эмбриологически никакого отношения не имеет.

Мюллеров, или парамезонефральный, проток, известен как источник развития эпителия верхней части влагалища, матки и фаллопиевых труб. Гистогенез органов женской репродуктивной системы с момента закладки до формирования дефинитивных структур включает комплекс сложных процессов: образование парамезонефральных протоков, формирование в них просвета, слияние протоков и последующие исчезновение перегородки между ними, а также замещение одного типа эпителия другим. Эти процессы являются последовательными и приводят в конечном итоге к формированию матки, маточных труб и влагалища. В области мезодермы на 4–5-й неделе онтогенеза формируется парное образование — первичная почка, в составе которой обнаруживаются мезонефральные тельца и каналы. Снаружи первичная почка покрыта мезотелием. Парамезонефральный проток или Мюллеров проток, являющийся источником, как говорилось выше, развития эпителия матки, маточных труб и верхней трети влагалища, лежит непосредственно под мезотелием первичной почки, стенка его состоит из столбчатых эпителиоцитов, расположенных на базальной мембране.

На 8–9 неделе внутриутробного развития происходит объединение парамезонефральных протоков путем слияния их медиальных стенок. Слившиеся парамезонефральные протоки к 10–11-й неделе эмбрионального развития растут по направлению к мочеполовому пространству. Между мезонефральными протоками и объединенными парамезонефральными протоками встраиваются клетки микроокружения, образуя тем самым «Мюллеров бугорок», клетки которого обладают признаками гетероморфизма. Яичники в процессе эмбриогенеза формируются из мезенхимы — в частности корковый слой, представленный прослойками рыхлой соединительной ткани и премордиальными фолликулами, и

мозговой слой, состоящий из сосудов, питающих орган, нервов и соединительной ткани. Мезотелий яичников развивается из целомического эпителия и является продолжением мезотелия органов брюшной полости и значительно отличается от Мюллера эпителия [4].

Аденокарцинома Мюллера протока впервые была описана в 1959 году M. Sweldrow. В своей работе «Мезотелиома тазовой брюшины идентичная папиллярной цистаденокарциноме яичников (*Mesothelioma of the pelvic peritoneum resembling papillary cystadenocarcinoma of the ovary*)» автор описал клиническое наблюдение односторонних опухолевых масс в полости малого таза. Опухоль происходила из левой маточной трубы без вовлечения в процесс слизистой оболочки последней. Правая маточная труба и оба яичника были интактны. Гистологически опухоль была представлена папиллярной аденокарциномой яичника. Автор предположил, что опухоль произошла из эпителия, имеющего единое эмбриологическое происхождение с эпителием матки и маточной трубы, и в данном наблюдении рак возник из клеток тазовой брюшины. Этот случай рассматривался как первое описание злокачественной опухоли Мюллера происхождения [111].

В 1999 году L. Dubeau выдвинул гипотезу согласно которой, источником серозных high-grade серозных карцином является не мезотелий покрывающий яичник, а производные Мюллера эпителия, в частности эпителий фимбриального отдела маточной трубы [34]. Позже, в 2007 году, С.Р. Crum et al. создали модель овариального канцерогенеза серозных карцином яичников, рассматривая дистальный конец маточной трубы в качестве источника опухоли и разделили серозные карциномы яичников на опухоли I и II типов (high-grade и low-grade карциномы) [30; 31].

Рассматривая в качестве потенциального источника развития серозного рака яичников не сам яичник, а эндометрий и эпителий маточной трубы, целесообразно рассмотреть молекулярно-генетические механизмы возникновения предраковых поражений и инвазивных карцином последних.



Согласно дуалистической модели, предложенной Я.В. Бохманом в 1983 году, рак эндометрия включает в себя два типа опухолей, различающихся между собой по патогенезу, морфологическому строению, рецепторному статусу и другим характеристикам, что обусловлено принципиально разными данными метаболического статуса пациенток [3]. Концепция Я.В. Бохмана гласит, что рак эндометрия (РЭ) I типа включает в себя группу опухолей (70–80% из них составляют эндометриоидные аденокарциномы), развивающихся на фоне гиперплазии эндометрия, вызванной длительной гиперэстрогемией, ассоциированной с метаболическим синдромом. РЭ II типа (неэндометриоидные аденокарциномы) включает в себя серозные, серозно-папиллярные и светлоклеточные карциномы, которые развиваются на фоне атрофического эндометрия у пациенток, не имеющих нарушений углеводного обмена и длительной эстрогеновой стимуляции в анамнезе. Благодаря многочисленным работам, направленным на изучение генетической гетерогенности РЭ, на сегодняшний день установлены различия в молекулярно-генетических признаках РЭ I и II типа. Известно, что РЭ I типа наиболее свойственна микросателлитная нестабильность (MSI), потеря функции *PTEN*, мутации *K-ras*, в то время как РЭ II типа характеризуется снижением экспрессии E-кадгерина и мутацией *TP53*, приводящей к гиперэкспрессии соответствующего белка, что позволяет использовать его для дифференциальной диагностики между аденокарциномами I и II типов [46]. Проводя параллели между патогенетическими теориями возникновения РЭ I и II типов, а также патогенезом рака эндометрия I и II типов нельзя не отметить явную схожесть молекулярно-генетических аспектов их развития.

В 1981 году S.C. Lauchlan первым описал подтип карциномы эндометрия, имеющей морфологическое сходство с серозной карциномой маточной трубы и яичников. При этом, пациентки погибали от прогрессирования заболевания, проявлявшегося в виде диссеминации опухоли в брюшной полости на фоне минимальной инвазии в миометрий или при полном ее отсутствии [55]. В 1995 году

R.A. Ambros et al. в своей работе продемонстрировали, что ИЭК является фоновым заболеванием по отношению к серозной папиллярной карциноме эндометрия (СПКЭ) — агрессивной форме карциномы с неблагоприятным прогнозом, отличающейся морфологическим сходством с серозной папиллярной карциномой яичников, раком фаллопиевых труб, и другими типами серозного рака [18]. ИЭК в полости матки зачастую мультифокальна по происхождению, может быть обнаружена на поверхности яичников и даже фаллопиевых труб. Аналогично теории развития эндометриоза, автором которой является Sampson J.A. (1927) [97], черзтрубная ретроперистальтическая миграция клеток из источника ИЭК может служить источником практически любого типа серозной карциномы [90]. Слабые межклеточные связи, обусловленные нарушением функции молекул адгезии E-кадгерин и A-катенин, легкая миграция в брюшную полость и имплантация опухолевых клеток на перитонеальную поверхность лежат в основе диссеминации процесса [9; 122] [18, 19]. Так же как эндометриоз, большинство интраперитонеальных карцином развиваются на поверхности и вблизи яичников. Имплантация предраковых клеток в фаллопиевых трубах, обнаруженных в исследовании L. Massuger (2010), может объяснить предраковые поражения фимбриальных отделов маточных труб [64]. Предположение, что эндометрий может служить еще одним из источников РЯ, подтверждается высоким профилактическим эффектом в отношении данной патологии, которым обладают перевязка маточных труб и гистерэктомия, гормональное влияние (оральные контрацептивы) и физиологические процессы (беременность, лактация), направленные на подавление овуляции.

В ряде исследований по изучению иммуноморфологического профиля серозных карцином различных локализаций (Nofech-Mozes S., 2008; Dabbs D.J., 2017) было показано, что для серозных карцином эндометрия не свойственна экспрессия WT1 в отличие от серозных карцином яичников, при которых практически всегда прослеживается ядерная экспрессия этого маркера [32; 78], ввиду чего мы сочли целесообразным оценить в диссертационном исследовании

экспрессию WT1 в образцах клеточного содержимого из полости матки у пациенток с серозным РЯ.

### **1.3 Морфологическая классификация и современная концепция развития серозного рака яичников**

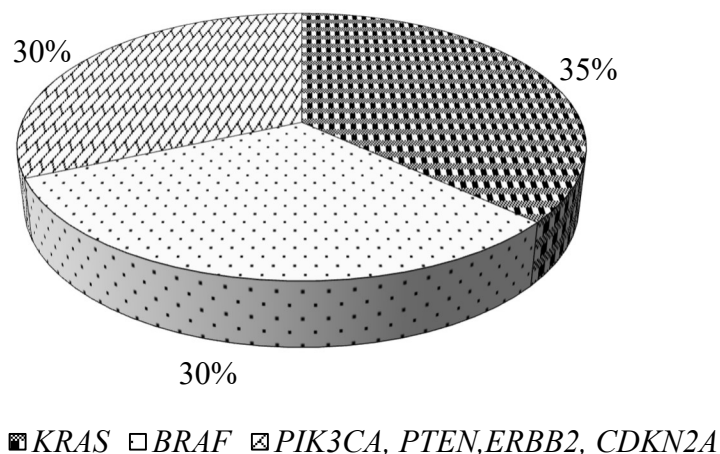
Полиморфная структура яичника определяет многообразие опухолей, происходящих из него. Злокачественные эпителиальные опухоли яичников или карциномы яичников — это группа гетерогенных заболеваний, которые обладают существенными различиями не только по морфологическим критериям и молекулярно-генетическому профилю, но и по происхождению, клиническому течению и прогнозу. Согласно морфологической классификации опухолей яичников, пересмотренной ВОЗ в 2014 году в Лионе (Франция) [86], карциномы яичников, т.е. эпителиальные злокачественные опухоли яичников, включают в себя серозные, муцинозные, серомуцинозные, эндометриоидные, светлоклеточные, низкодифференцированные аденокарциномы и злокачественные опухоли Бреннера. Как уже упоминалось ранее, аденокарциномы яичников в большинстве случаев (80–85%) представлены серозными формами [13]. Изучению этой группы опухолей посвящено настоящее исследование.

Возвращаясь к классификации R. J Kurman и I.-M. Shih (2010), выделяют два типа серозного РЯ [52]. Опухоли I типа — группа карцином низкой степени злокачественности (low-grade СКЯ, LGSC), ассоциированных с пограничным поражением в виде фона, чаще выявляются на ранних стадиях, характеризуется более длительным клиническим течением и большей генетической стабильностью, чем опухоли II типа. Low-grade СКЯ, ранее классифицируемые как G1, как правило, менее агрессивны, развиваются поэтапно — от серозных цистаденом (которые могут быть следствием избыточной пролиферации эпителия инклюзионных кист, эктопии Мюллера эпителия, эндосальпингоза, метаплазии мезотелия, покрывающего яичник) по мере накопления мутаций к пограничным опухолям, и только в 5–10% случаях малигнизируются в LGSC, имеют сходное с последними

микропапиллярное строение, но отличаются от них инвазивным, деструктивным ростом и способностью к отдаленному метастазированию [38; 119].

По данным R. Kurman et al. в наибольшем количестве наблюдений (около 67%) развитие low-grade СКЯ ассоциировано с мутациями генов *K-RAS* и *BRAF* [52], мутации генов *PTEN*, *CDKN2A*, *PIK3CA*, составляет около 30% [38; 92; 107].

Гены *KRAS* и *BRAF* являются регуляторами RAS/RAF/MEK/ERK/MAP сигнального пути, играющего важную роль в передаче пролиферативных сигналов ядру клетки [92]. Мутации генов *BRAF* и *KRAS* обуславливают избыточную активацию этого сигнального пути, гиперпролиферацию и последующую злокачественную трансформацию клеток. Мутации гена *KRAS*, локализованные в 12 и 13 кодоне, а также мутации гена *BRAF*, локализованные в 599 кодоне, обнаруживаются в 35% и 30% наблюдений серозных low-grade карцином и в 33% и 28% наблюдений атипических пролиферирующих опухолей яичников (пограничных опухолей яичников) соответственно, практически всегда отсутствуя в образцах ткани опухоли при high-grade СКЯ (Рисунок 3) [51].



**Рисунок 3** — Молекулярно-генетический профиль low-grade СКЯ [51]

Следует отметить, что мутации генов *BRAF* и *KRAS* являются одним из первых этапов развития low-grade опухолей яичников, что было доказано в работе S. Jones et al. (2012) [45]. Авторами выполнено исследование образцов ткани

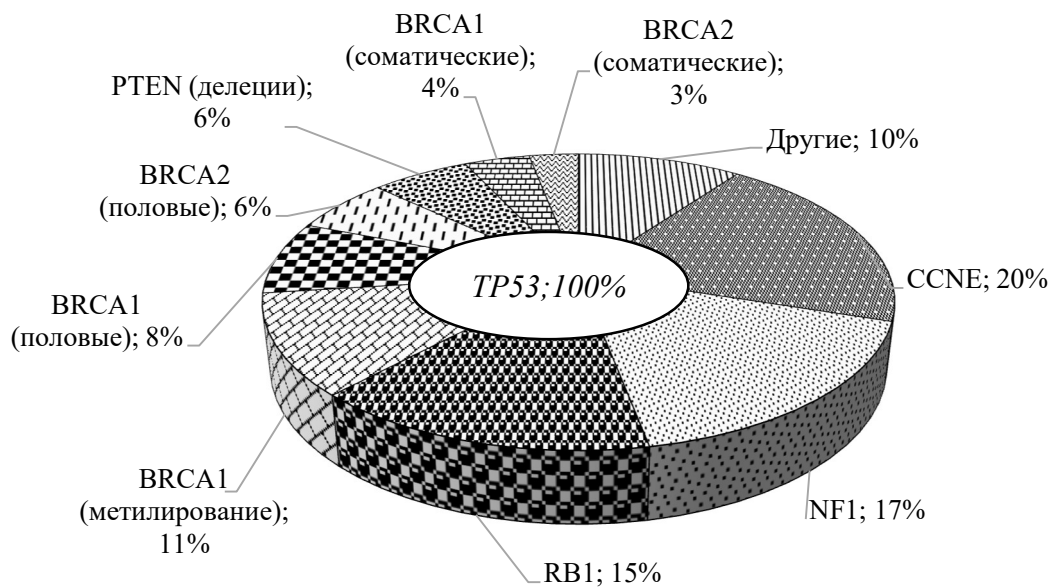
пограничных опухолей яичников серозного типа и примыкающих к ней участков эпителия доброкачественной цистаденомы, на фоне которой, по мнению исследователей, она и возникла. Установлено, что 7 из 8 (88%) образцов имели положительный статус в отношении исследуемых мутаций: 3 образца пограничных опухолей яичников содержали идентичные мутации гена *BRAF*, 4 — мутации гена *KRAS*. При этом наличие мутаций в одном из генов исключало в образце присутствие мутаций другого, и точно такие же мутации были выявлены в ткани доброкачественных цистаденом у 6 из 7 (86%) пациенток, несмотря на отсутствие морфологических признаков атипии [45]. Эти данные свидетельствуют в пользу того, что мутации генов *KRAS* и *BRAF* являются ранними этапами овариального канцерогенеза при развитии серозных опухолей низкой степени злокачественности.

Неоспоримым доказательством развития LGSC на фоне пограничных опухолей, является идентичное клиническое течение и прогноз в подавляющем большинстве наблюдений. Shvartsman et al. в своей работе проанализировали результаты лечения 2 групп пациенток, страдающих low-grade серозными карциномами яичников: группы первичных больных с II–IV стадиями болезни (n=112) и группы больных с рецидивом болезни серозных пограничных опухолей в виде low-grade карциномы (n=41). В результате проведенного анализа установлено, что статистически значимых различий как в общей выживаемости, так и во времени до прогрессирования между исследуемыми группами больных не прослеживается [106].

Опухоли II типа — это high-grade серозные карциномы (high-grade СКЯ, HGSC), ранее классифицируемые как G2 и G3, составляют около 75% от общего количества РЯ [13]. Эта группа РЯ, развиваясь «de novo», характеризуется агрессивным клиническим течением, и в большинстве наблюдений диагноз устанавливается на поздних стадиях, когда эффективность лечения значительно ниже. Стоит отметить, что эти опухоли демонстрируют выраженную генетическую

нестабильность, для них характерны мутации в генах *TP53*, *BRCA1*, *BRCA2* при отсутствии мутаций, свойственных опухолям I типа (Рисунок 4) [13; 51].

Источником развития HGSC по современным представлениям могут служить инклюзионные кисты на поверхности яичника, происхождение которых до сих пор остается предметом дискуссий. Сторонники трубного происхождения опухолей яичников склонны утверждать, что источником РЯ в большинстве наблюдений являются инклюзионные кисты, представляющие собой не что иное, как слущенный с поверхности фимбриального отдела маточной трубы эпителий, способный имплантироваться на поверхность яичника и проникать в его корковый слой [19].



**Рисунок 4** — Молекулярно-генетический профиль high-grade СКЯ [51]

Согласно альтернативным мнениям, инклюзионные кисты — это результат метаплазии плоского покровного эпителия яичника в цилиндрический, обладающий трубным фенотипом [79].

Так, в работе А. Ozkan et al. (2012) при изучении особенностей строения эпителия, выстилающего инклюзионные кисты, было показано, что экспрессия белков PAX2 и PAX8, ранее свидетельствующая о принадлежности эпителия к

фимбриальному отделу маточной трубы, прослеживается и в части плоских эпителиоцитов мезотелия яичника, причем клетки, которые не экспрессировали эти маркеры, располагаются рядом с экспрессирующими [82]. Подобные данные свидетельствуют в пользу вероятной метаплазии покровного эпителия яичника, на фоне которой возможно развитие HGSC. По мнению R.E. Scully (1995), инклюзионные кисты выстланы эпителием, имеющим мезотелиальный фенотип, что также свидетельствует в пользу экстраовариального происхождения серозного РЯ [102].

Понимание патогенеза серозных high-grade карцином возникло при изучении механизмов овариального канцерогенеза у носительниц мутации генов *BRCA1* и *BRCA2*. Как отмечено ранее, с начала 2000-х годов многочисленные работы, большинство из которых были посвящены определению роли профилактической сальпингоовариоэктомии в снижении риска развития РЯ, стали рассматривать фимбриальный отдел маточной трубы в качестве одного из источников серозного рака органов полости малого таза [20; 33; 95; 103; 105; 110; 120]. Потенциальное предраковое поражение, а именно серозная трубная интраэпителиальная карцинома (СТИК), было обнаружено в фимбриальном отделе маточных труб пациенток, которые подверглись профилактической сальпингоовариоэктомии в связи с высоким риском развития *BRCA*-ассоциированного РЯ [65]. Те же самые изменения, то есть клетки с мутацией гена *TP53* (сигнатура p53), СТИП, СТИК и инвазивная карцинома маточной трубы были обнаружены при морфологическом исследовании операционного материала пациенток со спорадическим серозным high-grade РЯ [49; 56].

СТИК маточной трубы есть не что иное, как скопления малигнизированного трубного эпителия, возникшего в результате нарушения функции гена-супрессора опухолевого роста *TP53*, что в свою очередь вызывает накопление патологического белка p53 в ядрах клеток маточной трубы, т.е. повышенную его экспрессию и позитивную ИЦХ реакцию.

Алгоритм диагностики СТИК включают в себя оценку таких параметров как:

1) выраженность морфологической атипии: увеличение клеточного ядра, неравномерное распределение хроматина, потеря полярности, повышенная митотическая активность и др.);

2) аномальную экспрессию p53: выраженная экспрессия (>75%) как следствие миссенс-мутации или, напротив, полное отсутствие экспрессии p53 в ядрах всех клеток как проявление «нулевого» паттерна или нонсенс-мутаций, ошибок рамки считывания и др.;

3) повышение пролиферативной активности: Ki67 >10%.

На основании оценки вышеперечисленных морфологических и иммуногистохимических критериев с внедрением протокола SEE-FIM (Sectioning and Extensively Examining the Fimbriated End), который в свою очередь был разработан с целью увеличения исследуемой площади поверхности слизистой маточной трубы, в настоящий момент установлено, что СТИК обнаруживается более чем в 60% образцов маточных труб у больных спорадическим high-grade РЯ [124]. Таким образом было доказано, что СТИК является предраковым поражением не только по отношению к наследственным формам HGSC.

Патогенез СТИК носит ступенчатый характер и включает в себя несколько последовательных этапов: трансформацию клеток нормального эпителия маточной трубы в «p53-signature» через мутацию гена *TP53* с последующим развитием СТИП и СТИК [77; 118]. В зарубежной литературе, посвященной патогенезу high-grade серозного РЯ, часто встречается понятие «p53-signature». Этим термином обозначены участки трубного эпителия, в котором, несмотря на отсутствие гистологических изменений, имеется 12 последовательно расположенных секреторных клеток с повышенной экспрессией p53, и низким пролиферативным индексом (низкой экспрессией Ki67). Следующим за «p53-signature» этапом канцерогенеза является СТИП, характеризующееся средней степенью атипии ядер эпителия маточной трубы, значительно менее выраженной по сравнению со СТИК. Также на данном этапе малигнизации секреторным клеткам маточной трубы



присущи низкий уровень экспрессии Ki67 и высокая экспрессия p53. По мере прогрессирования заболевания, уже скомпрометированные клетки СТИП приобретают все более выраженные признаки атипии, несколько повышается индекс Ki67 (до 10%), значительно более выраженной становится экспрессия p53, что и является критериями, по которым возможно судить о развитии СТИК. Далее эти клетки слущиваются, приобретают способность мигрировать как в полость матки, так и в брюшную полость, становятся в этих анатомических зонах потенциальными источниками развития серозного рака [118]. Кроме того, аналогично клеткам HGSC, СТИК характеризуется такими трансляционными изменениями как гиперэкспрессия p16 (*CDKN2A*), утрата Rb-протеина, FOXO3a, Pax2, LKB1, повышенная активация *PI3K*-сигнального пути, циклина E и ряда других [37; 47; 47; 58; 69; 91].

В свете перечисленных фактов особого внимания на наш взгляд заслуживает работа S. Intidhar Labidi-Galy et al. (2017), в которой были представлены результаты полногеномного секвенирования и анализа копий микродиссекционированных участков поражения маточных труб, яичников и метастатически пораженных лимфатических узлов 9 пациенток, страдающих СКЯ [53]. Большинство ассоциированных с опухолью альтераций были представлены в клетках СТИК, среди которых наиболее часто прослеживались мутации генов *TP53*, *BRCA1*, *BRCA2* или *PTEN*. Анализируя развитие СТИК, было установлено, что сигнатура p53 и СТИК являются предшественниками карциномы яичников, а для перехода СТИК в инвазивную серозную карциному яичников, которая способна довольно быстро метастазировать в первую очередь имплантационным и лимфогенным путем, требуется временной интервал порядка 7 лет. Чтобы установить характер взаимоотношений между клетками опухоли яичников и маточной трубы у пациенток, было проведено полногеномное секвенирование 37 образцов опухоли от 5 пациенток с диагностированным спорадическим серозным раком яичников после выполнения первичной циторедуктивной операции. Образцы включали в себя СТИК, карциному маточной трубы, карциному яичников у всех 5 пациенток,

а также метастазы в аппендиксе, прямой кишке, большом сальнике 3 пациенток, сигнатуру p53 у 2 пациенток и СТИК контралатеральной по отношению к пораженному яичнику маточной трубы. Было выявлено 33 смысловых мутации в каждом образце опухоли, после чего выявленные мутации были оценены во всех образцах опухоли каждой конкретной пациентки для установления принадлежности клеток к одному клону. Кроме того, были проанализированы микродиссекцированные участки СТИК у четырех *BRCA1/2*-позитивных пациенток после профилактической билатеральной сальпингоовариэктомии в трех наблюдениях, в которых односторонняя СТИК являлась случайной находкой, и у 1 больной с выявленной двусторонней СТИК после операции по поводу опухоли малого таза. Во всех наблюдениях использовался метод лазерной микродиссекции (laser capture microdissection, LCM) для выделения клеток после ИГХ исследования с оценкой экспрессии p53 в клетках СТИК и наличия p53 сигнатуры. Все остальные образцы были подвергнуты микродиссекции после окраски гематоксилином. Кровь, нормальная строма яичника, нормальная ткань тела и шейки матки использовались в качестве контроля. Во всех образцах анализ последовательностей и структурных альтераций свидетельствовал в пользу того, что p53 сигнатура или СТИК содержат клон предков для исследуемых случаев рака. Эти эволюционные взаимоотношения явились следствием того, что идентичные мутации в клетках сигнатуры p53, СТИК, ткани опухоли яичников и метастазов прослеживались во всех образцах тканей каждого отдельно исследуемого наблюдения. Стоит подчеркнуть, что клетки карциномы яичников во всех случаях продемонстрировали те же мутации, что и изучаемый эпителий маточной трубы, также являясь носителями дополнительных изменений, что подтвердило дочернюю принадлежность по отношению к сигнатуре p53 и СТИК. Аналогично клетки карциномы яичников являются прямыми родственными клонами для метастазов в исследуемых наблюдениях [53].

Рассматривая вопросы происхождения high-grade СКЯ нельзя не упомянуть об особенностях строения трубно-перитонеальной переходной зоны, как наиболее

«уязвимой» с точки зрения малигнизации анатомической области [2]. Трубно-перитонеальная, яичниково-перитонеальная и трубно-яичниковая переходные зоны представляет собой не что иное как «стык» двух типов эпителия, локализующийся между фимбриальным отделом маточной трубы, выстланным секреторными и ресничатыми однорядными эпителиоцитами и мезотелием, покрывающей яичник, который представлен однослойным плоским эпителием. Аналогично месту перехода влагалищной порции шейки матки в эндоцервикс, а именно области, в которой стыкуются два типа эпителия — плоский и цилиндрический, трубно-перитонельная переходная зона содержит плюрипотентные клетки и эпителиоциты с низкой дифференцировкой, то есть клетки с высоким пролиферативным потенциалом. A. Flesken-Nikitin et al. (2013) при исследовании покровного эпителия яичника в области яичниково-перитонеальной переходной зоны установили, что для этих эпителиоцитов характерна экспрессия ряда маркеров стволовых клеток, таких как ALDH1, LGR5, LEF1, CD133[36] По мнению авторов, инактивация генов-супрессоров опухолевого роста в клетках переходной зоны может служить одним из механизмов развития high-grade СРЯ.

Обобщая все вышеизложенное, логичным будет сделать вывод, что LGSC и HGSC — это абсолютно разные с точки зрения патогенеза заболевания, что непременно должно находить свое отражение в разработке диагностических методов, направленных на раннюю выявляемость. A. Melpica et al. (2007) сформулировали гистологические критерии, опираясь на которые, стало возможно дифференцировать low-grade и high-grade карцином яичников: деструктивная инвазия клеток опухоли в строму яичника и ее глубина, выраженность клеточной атипии, особенности строения ядра, митотическая активность опухоли, сочетание карциномы с дисплазией эпителия маточной трубы или развитие на фоне пограничных опухолей яичников.

Данная патогенетическая модель серозных карцином нашла свое отражение в клинической практике [61]. Существенные различия в молекулярно-

генетических основах развития и характере клинического течения послужили основанием для детального изучения эффективности применяемых методов лечения СКЯ обоих типов. Серия работ, посвященных изучению роли платиносодержащей неоадьювантной химиотерапии в лечении low-grade серозных карцином, продемонстрировала низкую ее эффективность по сравнению с таковой у больных high-grade СКЯ [100; 101]. При оценке эффективности неоадьювантной химиотерапии у больных low-grade карциномами (n=53) было установлено, что полный ответ на терапию, а именно отсутствие макроскопически определяемых очагов заболевания по данным МРТ наблюдали только у 4% пациенток, стабилизация процесса отмечалась у 88%, прогрессирование — у 8% [100].

A. Santillan et al. (2007) сравнили результаты лекарственной терапии таксанами и препаратами платины 13 больных с рецидивом low-grade РЯ с результатами лечения 31 пациентки с рецидивом high-grade РЯ [98]. Резистентность к препаратам определялась на образцах ткани опухоли, полученных во время операции. По сравнению с high-grade, low-grade серозный рак яичников продемонстрировал большую устойчивость к паклитакселу (69% против 14%,  $p < 0,001$ ) и карбоплатину (50% против 17%,  $p = 0,05$ ). В связи с вышеизложенным, становится очевидной необходимость разработки высокочувствительного и специфичного метода морфологической верификации рака яичников, который позволил бы установить гистологический подтип опухоли в амбулаторных условиях, снизив тем самым экономические затраты, выбрать оптимальную тактику лечения, а также улучшить показатели выживаемости больных РЯ.

## 1.4 Традиционные методы лабораторной и инструментальной диагностики рака яичников

Как отмечено ранее, в клинической практике РЯ I–II стадий скорее случайная находка, чем результат ряда диагностических манипуляций, непосредственно направленных на поиск конкретно этого заболевания. Помимо отсутствия ранней клинической симптоматики, которая могла бы стать причиной обращения пациентки за медицинской помощью, отсутствие эффективных скрининговых программ рака яичников продолжают сводить к минимуму число случаев, диагностированных на ранних стадиях, обуславливая высокий уровень смертности и больших экономические затраты на лечение этой категории пациентов.

На сегодняшний день установлено, что при серозном раке яичников имеет место повышение целого ряда онкомаркеров сыворотки крови, среди которых наиболее значимыми являются СА-125 и HE4.

СА-125 (cancer antigen 125, MUC16), был впервые описан в 1981 году при исследовании возможностей иммунотерапии РЯ (R.C. Bast et al.) [21]. СА-125 — фетальный онкобелок, содержащийся в эпителии серозных оболочек плода и тканях — производных эпителия целома, а именно в эпителии Мюллера, в клетках выстилающих брюшину, плевру и перикард. Структура маркера представлена гликопротеиновым эпитопом высокомолекулярного муцина (4000кДа) с молекулярной массой около 200 кДа, протеиновый компонент которого состоит из N-терминального домена, области двойного повтора и короткого цитоплазматического домена, а углеводный компонент — из O-связанных гликанов. Средний уровень маркера у здоровых женщин составляет от 7,0 до 25,9 ед/мл не превышая дискриминационное значение, которое составляет 35 ед/мл [23]. Однако при таких физиологических состояниях как беременность (чаще I триместр) и менструация может наблюдаться транзиторное повышение СА-125, что, вероятно, связано с увеличением толщины эндометрия, где прежде всего в норме и выявляется данный маркер. Стоит отметить, что экспрессия СА-125 не ограничивается только эндометрием, эпителием маточных труб и эндоцервиксом,

данный антиген присутствует в простате, молочной железе, конъюнктиве глаза и бронхиальном дереве. Повышение маркера СА-125 наблюдается при патологических состояниях, сопровождающихся вовлечением в процесс серозных оболочек — перитоните, острых воспалительных заболеваниях органов брюшной полости и, в частности, малого таза, асците неопухолевой этиологии, когда источником антигена является реактивный мезотелий, при экссудативном плеврите, перикардите [83]. Повышение уровня маркера наблюдается также при III–IV степени эндометриоза — до 78,8% случаев и доброкачественных опухолях яичников — до 30, 8%, миоме матки — до 8% [1].

Повышение уровня маркера СА-125 и порой весьма значимое, до тысяч единиц, может наблюдаться при раке печени (75%), поджелудочной железы (55%), желчных протоков (45%), легкого (40%), эндометрия (35%), желудка (30%), шейки матки (25%), молочной железы (20%), толстой кишки (15%) [86]. К сожалению, последующие за открытием маркера многочисленные исследования продемонстрировали его недостаточную чувствительность и специфичность для применения в качестве скринингового метода диагностики рака яичников. Большое количество ложно-положительных результатов приводит к снижению диагностической чувствительности теста, особенно при подозрении на ранние стадии рака яичников, когда уровень СА-125, как правило, или остается в пределах нормы или демонстрирует не столь выраженное повышение, как при распространении заболевания, порой превышая в такой ситуации сотни и тысячи ед/мл [22; 43; 67; 83; 86; 86]. По данным G. Sölétormos et al. (2016), I стадия характеризуется повышением СА-125 в 50–60% наблюдений, II— в 80–90%, III–IV— более чем в 90%. Специфичность маркера в отношении рака яичников составляет 94–98,5% и зависит от исследуемой выборки [108]. Широкое применение маркер нашел при мониторинге больных раком яичников, при рецидивах болезни, когда прирост его может отмечаться за 3–5 мес. до его клинических проявлений [73; 74; 108].

Исследования с историческим контролем обнаружили достаточно высокую специфичность сочетания УЗИ и СА-125, а также увеличение доли ранних стадий и вероятное улучшение выживаемости [116], что было подтверждено результатами трех масштабных рандомизированных исследований: PLCO (Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer Screening Randomized Controlled Trial), UKCTOCS (United Kingdom Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening) и SCSOCS (Shizuoka Cohort Study on Ovarian Cancer Screening). Данные японских исследователей к настоящему времени не опубликованы, поэтому остановимся на результатах первых двух работ.

Исследование, охватившее достаточно продолжительный период — с 1993 по 2001 годы, — проходило в 10 клиниках США, вошедших в состав PLCO (Prostate Lung Colorectal Ovarian). В рандомизированное контролируемое исследование рака простаты, легких, колоректального рака и РЯ вошли 78 216 женщин в возрасте от 55 до 74 лет, а полученные данные не продемонстрировали специфического увеличения выживаемости в группе подвергнутой анализу уровня маркера СА-125 в сыворотке крови в комбинации с трансвагинальным УЗИ (в течение 4 лет) в сравнении с группой женщин, не подвергнутой данному обследованию (в течение 6 лет), даже при увеличении медианы наблюдения до 15 лет. В группе женщин, проходивших обследование, было диагностировано 243 случая рака яичников, а также рака маточной трубы и брюшины, причем стоит отметить, что 73 из них выявлены во время скрининга, 28 пациенткам диагноз установлен через 1 год после начала программы по обследованию, и 114 через 2 года после начала программы. За весь период наблюдения в контрольной группе выявлено 218 пациенток с аналогичным диагнозом. Различия в 5-летней выживаемости в группе скрининга и в группе контроля не продемонстрировали статистически значимых различий: для пациенток, проходивших ежегодное обследование на уровень СА-125 в комбинации с трансвагинальным УЗИ этот показатель составил 47,7%, против группы контроля, где скрининг вышеперечисленными методами не проводился — 36%. Помимо этого, к 10 годам

результаты практически стали идентичными — 31,3% против 27,1%. Стоит отметить, что в процессе скрининга было получено 3285 ложноположительных результатов, по поводу которых проведено 1080 операций, 163 из которых сопровождались различного характера осложнениями. Подводя итог, несмотря на ожидаемые результаты, исследование не продемонстрировало эффективности комбинации определения уровня сывороточного СА-125 и трансвагинального УЗИ в качестве скрининга РЯ в общей популяции [86].

С 2001 по 2005 годы в Великобритании под руководством National Health Service проходило более крупное испытание UKSTOCS UK (Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening), посвященное оценке экономической эффективности скрининга РЯ, согласно которому все испытуемые ( 202 638 женщин в возрасте от 50 до 74 лет) были разделены на три группы в соотношении 1:1:2, в которых первая группа, подверглась мультимодальному скринингу (multimodal screening, MMS), вторая группа подверглась транвагинальному УЗИ только при наличии превышения нормального значения маркера СА-125 в сыворотке крови, и третья, она же контрольная группа, скрининг вышеперечисленными методами не проходила. Результаты были несколько противоречивы — первичный анализ не продемонстрировал статистически значимых данных в пользу проведения скрининга, однако при сравнении уровня выживаемости группы больных, проходящих мультимодальный скрининг и контрольной группы была обнаружена тенденция к снижению смертности в первой группе, которая возникла после 7-го года наблюдения [62].

В этом контексте следует отметить, что понимание молекулярных характеристик онкогенеза рака яичников может способствовать раннему выявлению заболевания с помощью множества подходов, таких как идентификация возможных предшественников, а также других биомаркеров как в сыворотке, так и в содержимом брюшной полости, полости маточных труб и матки.



## 1.5 Клеточные маркеры в морфологической диагностике серозного рака яичников

В настоящее время для морфологической диагностики СКЯ повсеместно используется иммуногистохимический (ИГХ) метод, основанный на определении экспрессии ряда маркеров. Среди них наибольшей информативностью, как уже было сказано выше, обладает комбинация маркеров p53, p16, WT1 [50; 87; 116]. Рассмотрим подробнее происхождение и роль каждого из них в канцерогенезе СКЯ.

### 1.5.1 Экспрессия маркера p53

Как отмечено ранее, белок p53 — это продукт гена-супрессора опухолевого роста *TP53*, расположенного в коротком плече 17 хромосомы, в локусе 17p13.1, содержащего 12 экзонов и регулирующего процессы клеточного цикла, апоптоза, репарации ДНК и ангиогенеза. Наследственный синдром Ли–Фраумени, ассоциированный с гаметными мутациями гена *TP53*, описанный в 1969 году F.P. Li и J.F. Fraumeni в докладе о семьях с разнообразными злокачественными опухолевыми заболеваниями, манифестирующими в детском возрасте (включая детские саркомы и рак молочной железы у молодых людей), наследуется по аутосомно-доминантному типу. Следует отметить, что женщины-носительницы половой мутации *TP53* имеют больший риск развития сигнатуры p53 и СТИК, чем в общей популяции с большей плотностью поражения маточной трубы: до 20 линейных сегментов сигнатур p53 в каждом срезе фимбрии [123].

Соматические мутации гена *TP53*, который в норме функционирует как основной «защитник» генома, приводят к нарушению внутриклеточных механизмов регуляции клеточного цикла, блокируя апоптоз и способствуя опухолевому росту, обнаруживаются более чем при 50% всех типов злокачественных опухолей человека. На сегодняшний день описано более 36000 мутаций гена *TP53* и наибольшую часть из них, а именно около 80%, составляют миссенс-мутации (т.е. мутации, ведущие к образованию миссенс-кодона, т.е. кодона с новым кодирующим смыслом), обуславливающие замену аминокислот в цепочке ДНК [57]. Согласно данным Международного общества по изучению рака

(International agency for research on cancer, IRAC, 2016) TP53, обнаружено 2329 мутаций гена *TP53*, характерных для рака яичников, 70% из которых представлены миссенс-мутациями, 8,6% — нонсенс-мутациями (т.е. бессмысленными мутациями, приводящих к образованию терминирующего трансляцию кодона, т.е. преждевременной остановке трансляции с образованием аномального полипептида), 12% — ошибками рамки считывания, причем наибольшее число из них как правило локализуется в 5, 6, 7, 8-м экзонах, несущих информацию о структуре центрального ДНК-связывающего домена (Рисунок 5) [125].



**Рисунок 5** — Функциональные домены белка p53 и локализация 5 наиболее частых мутаций, характерных для рака яичников (номера соответствуют позициям аминокислот). NLS – nuclear localization signal (сигнал ядерной локализации), NES – nuclear export signal (сигнал ядерного экспорта) [125]

В норме белок p53 является короткоживущим белком, выполняет функцию ядерного транскрипционного регулятора, участвуя во многих клеточных процессах. Связываясь с молекулой ДНК, p53 контролирует экспрессию большинства генов-мишеней, что вносит существенный вклад в поддержание целостности генома. Белок p53 инициирует процесс репарации ДНК при ее повреждении, с помощью стимуляции синтеза белка p21, который в свою очередь связывается с циклинами, тормозя их активность и останавливая клеточный цикл в контрольной точке G1/S. По мере устранения повреждений ДНК концентрация p21 в клетке уменьшается, происходит активация циклинов и клетка

переходит в фазу S. Если же репарация ДНК невозможна, p53 инициирует запуск апоптоза посредством экспрессии Puma, Bax или miR-34 [26; 71; 75].

Известными на сегодняшний день внешними факторами, способствующим активации p53 за счет повреждения ДНК, являются ультрафиолетовое и радиационное излучения, необоснованная активация протоонкогенов, повышение митогенной активности, повреждение рибосом или ядра клетки вследствие гипоксии и окислительного стресса [25; 44; 66].

Таким образом, посредством вышеописанных механизмов, опухолевый супрессор p53 координирует все основные процессы поддержания генома, являясь важнейшим компонентом системы контроля повреждений в клетке. При наличии мутации соответствующего гена, наблюдается «гиперэкспрессия» белка p53 в клетках, что свидетельствует об их злокачественной трансформации [38]. Нельзя не отметить наличие положительной корреляционной взаимосвязи между увеличением экспрессии p53, нарастанием морфологической атипии и степени злокачественности.

Оценка экспрессии p53 в клетках и ткани опухоли производится иммунологическими методами с применением моноклональных антител. Интенсивное диффузное окрашивание ядер клеток свидетельствует о наличии миссенс-мутаций гена *TP53* (гиперэкспрессия, аномальный паттерн), полное отсутствие окрашивания ядер – о бессмысленных мутациях, т.е. нонсенс-мутациях, ошибках рамки считывания, слабое диффузное окрашивание— о диком типе гена *TP53*.

### ***1.5.2. Экспрессия маркера p16***

Среди генов-супрессоров опухолевого роста, в качестве одного из главных участников овариального канцерогенеза, помимо гена *TP53*, следует рассмотреть *CDKN2A*, локализованный в коротком плече 9 хромосомы. *CDKN2A* — это ингибитор циклин-зависимой киназы 2A, кодирующий два белка, имеющих разные рамки считывания: p16<sup>INK4a</sup> и p14<sup>ARF</sup>.

Циклин-зависимые киназы (cyclin-dependent kinases, CDK) — группа белковых молекул, которые участвуют в процессах регуляции клеточного цикла посредством фосфорилирования регуляторных белков, что в свою очередь происходит при взаимодействии определенного CDK с циклином (активаторной субъединицей). Изменение внутриклеточной концентрации циклинов, а именно их увеличение, и фосфорилирование определенных аминокислотных остатков обеспечивают регуляцию активности CDK, и такие волны активации обеспечивают смену фаз клеточного цикла. Основной функцией p14<sup>ARF</sup> является регуляция клеточного цикла за счет ингибирования белка p53. Главная роль белка p16 в клетке состоит в отрицательной регуляции клеточного цикла за счет ингибирования комплекса циклина D1 с CDK4/6, которое приводит к остановке клеточного цикла в фазе G1, блокируя переход в фазу S [60]. Утрата белка p16 из-за мутации соответствующего гена приводит к блокированию сигнальных путей, опосредованных циклинами, в связи с чем утрачивается контроль над клеточным циклом, активируются гены, обуславливающие входение клетки в S-фазу клеточного цикла, что было показано в эксперименте. В свою очередь нарушения в G1 фазе и G1/S контрольной точке приводят к неконтролируемой клеточной пролиферации, росту опухолей.

В норме белок p16 является маркером старения клетки и ингибитором клеточного деления, которое может возникнуть в ответ на гиперпролиферативные сигналы, повреждение ДНК и окислительный стресс. При этом экспрессия белка p16 может варьировать в достаточно широком диапазоне, и маркер p16 может определяться иммуногистохимическим методом как в ядре клетки, так и в цитоплазме (гетерогенный паттерн экспрессии p16). Отсутствие экспрессии p16 и его гиперэкспрессия являются патологическими и свидетельствуют о злокачественной трансформации клетки. Отсутствие экспрессии p16 в клетке может возникать вследствие трансляционной супрессии, гиперметилирования промотора, гомозиготной делеции и других мутаций, влекущих за собой утрату функции *CDKN2A* [104]. При раке яичников гомозиготная делеция *CDKN2A*

обнаружена только в 3% high-grade серозных карцином, в 15% low-grade серозных карцином и в 30% муцинозных карцином [41; 46; 68; 88; 93].

Установлено, что гиперэкспрессия клетками белка p16 наблюдается при ВПЧ-ассоциированных опухолях шейки матки, аногенетальной области, high-grade плоскоклеточном интраэпителиальном поражении (HSIL), гиперпластических процессах эндометрия и протоковой карциноме молочной железы [46]. Кроме того, в последние годы утверждена диагностическая и прогностическая значимость маркера p16 в отношении серозных карцином яичников. Так, в исследовании С.Ж. О'Нейлл et al. (2007) приняли участие 18 пациенток с пограничными опухолями яичников, 22 пациентки с LGSOC и 24 с HGSOC. В ходе исследования была выполнена оценка интенсивности и распределения окрашивания ядер клеток при реакции с МКАТ к p16 в ткани опухоли больных исследуемых групп. В результате исследования установлено, что различия экспрессии p16 являются статистически значимыми: при HGSOC наблюдается выраженная окраска практически 100% ядер клеток, в то время как при LGSOC экспрессия p16 значительно менее выражена и носит диффузный характер. Исследование также продемонстрировало отсутствие статистической значимости различий экспрессии p16 в ткани опухоли больных LGSOC и больных пограничными опухолями яичников [80].

Согласно данным исследования Р.Ф. Рамбау et al. (2018), посвященного изучению прогностической ценности p16, уровень 5-летней выживаемости пациенток с low-grade серозными карциномами, в препаратах которых при ИГХ исследовании экспрессия белка p16 была отрицательной или, напротив, определялась гиперэкспрессия, значительно ниже в сравнении с таковой в группе больных, в чьих материалах выявлена диффузная экспрессия p16 [88].

А.Д. Алтман et al. (2013) проанализировали 582 образца опухоли больных high-grade СКЯ, 45 образцов low-grade карцином и 49 образцов пограничных

серозных опухолей яичников: целью работы стал анализ информативности ИГХ исследования ткани опухоли на мутации генов *TP53* и *CDKN2A* в аспекте дифференциальной диагностики high и low-grade карцином [17]. Установлено, что определение в клетках ткани опухоли дикого типа гена *TP53*, при котором в ядрах клеток отсутствует патологический p53 (в связи с чем нет соответствующего окрашивания при ИГХ исследовании), в сочетании с мутацией гена *CDKN2A*, при котором наблюдается диффузная экспрессия белка p16 и соответствующее окрашивание препарата, является методом диагностики серозных low-grade карцином яичников, обладающим чувствительностью 89% и специфичностью 93%. При этом прогностическая ценность положительного результата составляет 68%, а прогностическая ценность отрицательного — 98% [17]. Принимая во внимание вышеизложенное, мы сочли целесообразным оценить экспрессию p16 в образцах клеточного содержимого из полости матки больных СКЯ.

### ***1.5.3 Экспрессия маркера WT1***

Маркер WT1 — белковый продукт одноименного гена-супрессора опухолевого роста *WT1*, локализованного в 11 хромосоме, состоящего из 11 экзонов и являющегося транскрипционным фактором из семейства «цинковых пальцев». Белки семейства «цинковых пальцев» (zinc finger family) — это цинк-содержащие белки-регуляторы клеточной транскрипции, состоящие из 2 цистеиновых и 2 гистидиновых остатков, взаимодействующих с ионом цинка, между которыми расположена последовательность аминокислот в виде «пальца». *WT1* участвует в развитии тканей, происходящих из мезодермы, в частности мочеполового тракта. Значительное увеличение экспрессии WT1 ассоциировано с развитием опухоли Вильмса — нефробластомы, названной именем в честь Карла Вильмса, впервые описавшего в 1899 опухоль почки у ребенка. В норме у взрослого человека WT1 экспрессируется эпителием клубочков почек, клетками децидуальной оболочки уретры, клетками гранулезы яичников у женщин и клетками Сертоли яичек и мужчин. Помимо этого, гиперэкспрессия WT1 имеет

место при клубочковой нефропатии, дисгинезии гонад, а также мезотелиоме, раке молочной железы, лейкемии, колоректальном раке, раке яичников и эндометрия.

В дополнение к вышеизложенному, нельзя не отметить, что WT1 является белком, регулирующим экспрессию ряда генов, которые вовлечены в процессы клеточной пролиферации и дифференцировки. Мутации соответствующего гена и обусловленная ими высокая пролиферативная активность могут являться причиной повышенной экспрессии WT1 как в ткани злокачественной опухоли, так и при предраковом поражении. На сегодняшний день установлено, что экспрессия WT1 имеет значительные различия при серозном раке тела матки и серозной аденокарциноме яичников, что связано главным образом с гистогенезом эндометрия и мезотелия, покрывающего яичники [14; 39; 42]. Чувствительность маркера WT1 в ИГХ диагностике серозных карцином при определении его экспрессии в ткани опухоли яичников по данным разных авторов достигает 90%, свидетельствуя главным образом о серозном типе РЯ, фаллопиевой трубы или брюшины, в то время как интенсивность окрашивания ядер опухолевых клеток может варьировать. Серозный рак эндометрия, как отмечено ранее, характеризуется отсутствием экспрессии WT1, что в свою очередь нашло свое отражение при проведении дифференциальной диагностики и определения гистогенеза серозных опухолей. Клиническое течение, как и подходы к лечению диссеминированных стадий серозного рака тела матки и яичников не имеют существенных различий. Экспрессия WT-1 ядрами клеток опухоли указывает на то, что первичный очаг находится не в эндометрии, а в маточной трубе, яичнике или брюшине [16; 40; 119]. Однако, необходимо учитывать, что в эпоху бурного развития таргетной терапии этот факт может служить потенциальной мишенью для будущего лекарственного воздействия, в связи с чем определение гистогенеза опухоли и ее молекулярно-генетических характеристик продолжает оставаться принципиально важным аспектом клинической онкологии.

## **1.6 Роль цитологического и иммуноцитохимического исследований в диагностике серозных карцином яичников**

Как отмечено ранее, для СКЯ характерно отсутствие ранней клинической симптоматики. Появление жидкости в брюшной и/или плевральных полостях являются проявлениями, позволяющими заподозрить болезнь лишь на III–IV стадии: по данным D.K. Chang и J.W. Kim, объем асцитической жидкости до 50 мл свидетельствует в пользу канцероматоза брюшины с вероятностью 12,5-25%, а при увеличении объема более 50 мл — до 75-100%. На дооперационном этапе обследования больных с подозрением на СКЯ диссеминированных стадий одним из информативных методов является цитологическое исследование выпотных жидкостей, которое позволяет достоверно определить злокачественную этиологию экссудата в 64% - 96% наблюдений. В связи вышеизложенным в настоящее время в клиническую практику стали активно внедряться дополнительные методы исследования, такие как жидкостная цитология и ИЦХ исследование.

В доступной научной литературе имеется ряд работ, посвященных изучению эффективности цитологического и ИЦХ методов исследования в диагностике онкогинекологических заболеваний. В 2016г. Леонов М.Г. и Беляева С.А. опубликовали результаты сравнительного анализа метода жидкостной цитологии и традиционного цитологического метода в исследовании экссудатов брюшной и плевральной полостей, а также интраоперационных смывов с брюшины при РЯ. По результатам проведенного исследования установлено, что диагностическая ценность метода жидкостной цитологии в диагностике РЯ и его рецидивов в 1,5 раза выше традиционного цитологического метода, а полученные при этом многослойные препараты могут быть использованы для последующего проведения ИЦХ реакций.

В работе Савостиковой М.В., посвященной изучению преимуществ и недостатков различных моделей жидкостных систем в цитологической и ИЦХ диагностике онкогинекологических заболеваний наглядно продемонстрировано, что применение ИЦХ исследования экссудата из брюшной и плевральных полостей



на эпителиальные маркеры (ЭМА, VerEp4) с применением системы Cytospin-3 позволяет выявить даже единичные клетки и мелкие комплексы клеток рака в полученных образцах [11; 12].

ИЦХ исследование подразумевает определение экспрессии молекулярных маркеров на клеточном уровне и имеет ряд преимуществ: в первую очередь это большая в сравнении с цитологическим методом чувствительность (93% против 62%) и специфичность (до 99% против 93%). Согласно данным как отечественных, так и зарубежных авторов сочетание цитологического и ИЦХ методов с использованием широкой панели моноклональных антител позволяют установить морфологический тип опухоли и даже первичный ее очаг в 93% наблюдений [11; 59].

В связи с морфологической гетерогенностью СКЯ широкое распространение получил метод иммуногистохимического исследования, который позволяет точно идентифицировать high-grade и low-grade типы РЯ. Однако, учитывая, что для выполнения данного исследования требуются образцы ткани опухоли, получить которые чаще всего возможно только в результате хирургических мероприятий, требующих анестезиологического пособия и стационарных условий, очевидной становится необходимость разработки нового подхода к дооперационной морфологической диагностике СКЯ. В качестве альтернативы ИГХ-методу все большее клиническое значение приобретает ИЦХ-метод, материалом для которого может служить не только асцитическая жидкость и плевральный экссудат, полученные в амбулаторных условиях. Учитывая анатомические особенности строения женской репродуктивной системы (наличие сообщения между влагалищем, цервикальным каналом, полостью матки, просветом фаллопиевых труб и брюшной полости, перистальтической активности маточных труб, обуславливающей способность раковых клеток регургитировать в полость матки), современные теории происхождения СКЯ и доказанную необходимость изначального определения морфологического их подтипа, мы сочли целесообразным исследовать диагностические возможности ИЦХ метода при

анализе аспирационного материала из полости матки на маркеры, характерные для этого типа опухолей.

### **1.7 Анализ содержимого полости матки в диагностике серозного рака яичников**

Авторами первых исследований по изучению информативности материала, полученного из полости матки и цервикального канала, в диагностике рака яичников и маточной трубы стали ученые из Японии. В 1985 году Takashina T. et al. опубликовали данные, согласно которым при исследовании смывов влагалища и шейки матки пациенток, страдающих tuboовариальным раком злокачественные клетки определялись в 37,9% наблюдений (22 из 58), а при исследовании смывов из полости матки — в 80% (12 из 15) [112]. По результатам анализа, проведенного I. Otsuka et al. в 2013 году, также был сделан вывод, что исследование содержимого из полости матки у больных серозным раком яичников, маточной трубы и брюшины может стать перспективным направлением в отношении разработки скрининга рака яичников. В исследование были включены 122 пациентки, страдающие первичным раком брюшины, маточной трубы и карциномами яичников различных гистологических форм (42 пациентки с high-grade СКЯ, 80 – с иными морфологическими типами). Распределение по стадиям было следующим: 37 пациенток (30%) с I стадией, 12 (10%) — II стадией, 60 (49%) — III стадией и 12 (10%) — IV стадией болезни по FIGO. Остальные испытуемые были классифицируемы как пациентки с 0 стадией заболевания. Всем больным было проведено цитологическое исследование смывов из полости матки, шейки матки и влагалища, в результате чего в полученном материале клетки карциномы обнаружены у 15 (12%) пациенток, из них 10 больных high-grade раком яичников. У 6 из 15 женщин диагноз удалось установить на ранних (0-II) стадиях. Интересно, что в 5 из 15 наблюдений в смывах с эндометрия у пациенток были выявлены клетки карциномы при отсутствии данных за наличие опухоли репродуктивной системы по результатам дополнительных методов исследования. В 1 наблюдении отмечалось увеличение уровня СА-125 до 386 Ед\мл. Хирургическое лечение было

выполнено 2 пациенткам из 5, в результате чего у одной из них был установлен диагноз светлоклеточного рака яичников. У другой пациентки при морфологическом исследовании операционного материала данных за злокачественный процесс получено не было. Однако, через 3 года после операции у пациентки возникли проявления перитонеального канцероматоза, вследствие позже установленного серозного high-grade рака. Стоит отметить, что именно в ее случае был получен положительный результат цитологического исследования смывов как из полости матки, как и из цервикального канала, при нормальном уровне СА-125 крови и полном отсутствии проявлений опухолевого процесса в полости малого таза. Основываясь на этих клинических наблюдениях, авторами был сделан вывод, что смывы из полости матки, цервикального канала и влагалища являются информативным материалом, а наибольшее диагностическое значение имеет их анализ в диагностике именно high-grade СКЯ [81].

Тогда же, в 2013 году, I. Kinde et al опубликованы результаты исследования образцов материала 46 пациенток (22 наблюдения РЭ и 24 - РЯ), полученных из цервикального канала. Было предположено, что опухолевые клетки при этих заболеваниях так же могут обнаруживаться и в содержимом цервикального канала (материал был собран щеткой для ПАП-теста — методики, которая стала рутинной в гинекологической практике). Методом широкомасштабного геномного секвенирования (whole-exome sequencing) было установлено, что 100% образцов материала при РЭ и 41% при РЯ содержат опухолевые клетки. Возможность обнаружения в этих клетках специфичных для каждого подтипа опухоли мутаций (в частности, свойственной серозной high-grade карциноме мутации p53) лежит в основе создания теста Pap Gene, разработанного одноименной компанией Pap Gene Inc. (США, Балтимор), специализирующейся на молекулярной диагностике. Технология уменьшения ошибок, разработанная основателями, была лицензирована, и в 2018 году именно это направление получило грант Fast-Track от Национального института рака США (National Cancer Institute), обозначив данный подход термином «генетическая цитология» [48].

В 2016 году под эгидой Американского сообщества клинической онкологии в свет вышла публикация, посвященная результатам анализа смывов из полости матки 65 больных опухолями Мюллера протока (30 пациенток страдающих РЯ, 5 — РЭ, 27 доброкачественными опухолями репродуктивных органов), выполненного в медицинском университете Вены (Австрия). Образцы смывов, как и ткань опухоли этих больных, исследовались на наличие целого ряда соматических мутаций генов *AKT1*, *APC*, *BRAF*, *CDKN2A*, *CTNNB1*, *EGFR*, *FBXW7*, *FGFR2*, *KRAS*, *NRAS*, *PIK3CA*, *PIK3R1*, *POLE*, *PPP2R1A*, *PTEN*, *TP53* методом массивно-параллельного секвенирования. В результате было установлено, что мутации (в большинстве наблюдений *TP53*) были выявлены в 18 (60%) из 30 образцов смывов из полости матки пациенток, страдающих РЯ. Анализ ряда мутаций, ранее определенных в соответствующей опухолевой ткани, привел к дальнейшей идентификации еще 6 пациентов. Таким образом, в 24 наблюдениях из 30 (80%) удалось идентифицировать свойственные для РЯ повреждения геномного аппарата; 8 из 27 пациенток (29,6%) с доброкачественными поражениями также дали положительный результат [63]. Эти данные свидетельствуют в пользу того, что определение молекулярно-генетических маркеров в материале, полученном из полости матки (смывы, аспираты), является весьма перспективным направлением в диагностике злокачественных опухолей как эндометрия, так и яичников.

## ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Дизайн исследования

Диссертационная работа выполнена на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России в период с 2013 по 2019 годы.

Для достижения поставленной цели и решения задач было проведено проспективное исследование, на первом этапе которого обследованы 272 пациентки, обратившиеся в «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по поводу опухолей яичников.

Всем пациенткам были выполнены УЗИ брюшной полости, органов малого таза и забрюшинного пространства, компьютерная томография органов брюшной полости и забрюшинного пространства с контрастным усилением и/ магнитно-резонансная томография органов малого таза с контрастным усилением, анализ крови на уровень сывороточного маркера СА-125 и аспирация содержимого полости матки. По результатам проведенного обследования хирургическое лечение на первом этапе было рекомендовано 185 пациенткам, а 77 пациенток были направлены на неoadъювантное лечение и исключены из исследования.

Первичная циторедуктивная операция выполнена 85 пациенткам, 31 больной произведена пангистерэктомия, 69 — двусторонняя аднексэктомия. По результатам морфологического исследования операционного материала диагноз серозного рака яичников был подтвержден у 71 больной. При анализе морфологического строения опухоли больные разделились следующим образом:

- 51 пациентка с серозными high-grade карциномами;
- 20 пациенток с low-grade карциномами;
- 50 пациенток с метастатическим поражением яичников из другого первичного очага;
- 50 пациенток с доброкачественными опухолями яичников;
- контрольная группа

Кроме того, после получения морфологического исследования операционного материала, из исследования были исключены пациентки с пограничными опухолями (n=3), муцинозными (n=4), эндометриоидными (n=5), светлоклеточными (n=2) карциномами придатков.

Дизайн исследования представлен на рисунке 6.

Обязательным условием включения пациенток в исследование являлось добровольно подписанное информированное согласие на обработку персональных данных, проведение обследования (в том числе и аспирации содержимого из полости матки) и лечения. Исследование одобрено Межвузовским Комитетом по этике МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России.

Критерии включения пациенток в исследование были следующими:

- возраст старше наступления менархе;
- наличие объемных (одно- или двусторонних) образований в области придатков матки по данным объективного осмотра и/или подтвержденного инструментальными методами обследования (УЗИ органов малого таза, КТ органов брюшной полости с контрастным усилением, МРТ органов малого таза с контрастным усилением);

У всех пациенток с опухолями яичников диагноз заболевания был подтвержден морфологически.

Критерии исключения пациентов из исследования были следующими:

- отсутствие возможности проведения хирургического лечения на 1 этапе и морфологического подтверждения диагноза;
- обнаружение отличной от серозной (муцинозной, эндометриoidной, светлоклеточной) формы РЯ, неэпителиальных ЗНО придатков, а также рака эндометрия, синхронные и метакронные опухоли по результатам морфологического исследования операционного материала;
- наличие в анамнезе экстирпации матки без придатков, двусторонней аднексэктомии;
- атрезия цервикального канала.
- неoadьювантная терапия по поводу РЯ в анамнезе;
- отказ пациентки от проведения аспирации содержимого полости матки.



**Рисунок 6** — Дизайн исследования

Стадирование заболевания выполнялось в соответствии с классификацией TNM 8-ое изд., FIGO от 2014 года [86].

## 2.2 Клиническая характеристика исследуемых больных

В исследование были включены 221 пациентка, средний возраст которых составил  $54,2 \pm 9,68$  года. При этом пациентки всех исследуемых групп были сопоставимы по возрасту ( $p > 0,05$ ).

В исследование в равной степени были включены женщины, находящиеся в репродуктивном периоде ( $n=52$ ; 23,5%), перименопаузе ( $n=58$ ; 26,2%), менопаузе ( $n=53$ ; 24%) и постменопаузе ( $n=53$ ; 24%). На момент аспирации содержимого из полости матки 45 женщин репродуктивного возраста находились в конце I фазе менструального цикла, 7 — во II-й.

Распределение пациенток в зависимости от морфологического строения опухоли представлено в таблице 1.

**Таблица 1** - Распределение пациенток по группам в зависимости от морфологического строения опухоли

Патология яичников	Количество образцов	Гистологическая форма	Количество образцов
Серозный рак яичников	71	High-grade	51 (71,8%)
		Low-grade	20 (28,2%)
Метастатическое поражение яичников	50	Рак молочной железы	15 (30%)
		Рак толстой кишки	9 (18%)
		Рак поджелудочной железы	8 (16%)
		Рак желудка	6 (12%)
		Рак почки	2 (4%)
Доброкачественные опухоли яичников	50	Зрелая тератома	8 (16%)
		Серозная папиллярная цистаденома	15 (30%)
		Текома	8 (16%)



		Эндометриоидная цистаденома	6 (12%)
		Муцинозная цистаденома	13 (26%)
Контрольная группа	50		

В I группу (n=71) вошли пациентки с серозным РЯ, средний возраст которых составил  $54,5 \pm 10,23$  года. Их них: 51 (71,8%) пациентка с high-grade СКЯ и 20 (28,2%) пациенток с low-grade СКЯ.

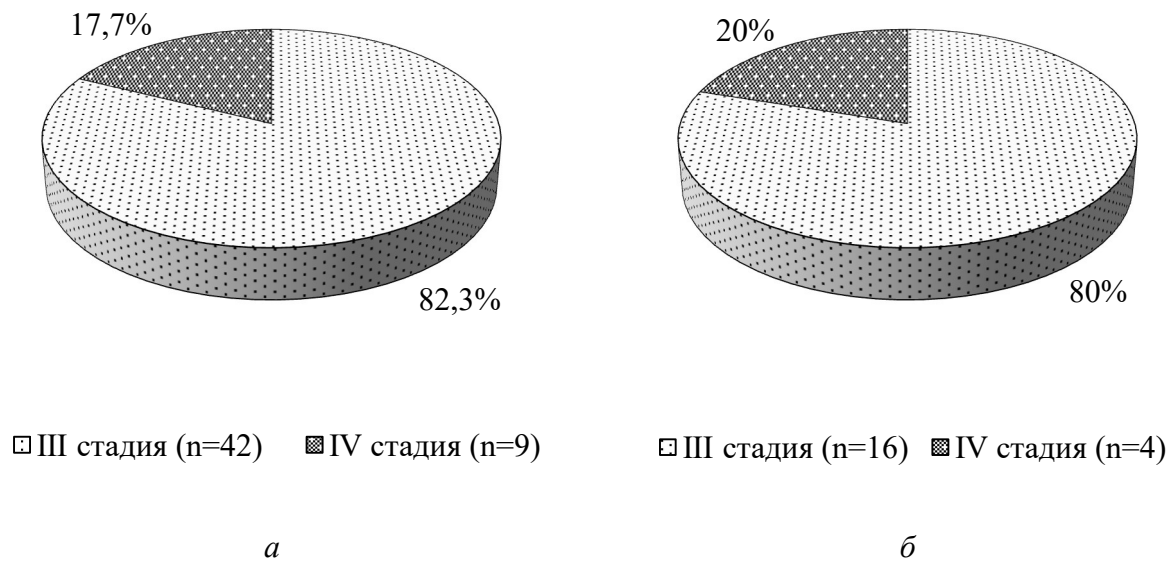
В зависимости от стадии заболевания пациентки I группы были разделены на две подгруппы.

В подгруппе IA серозных high-grade карцином яичников (n=51) большинство пациенток (n=42; 82,3%) имели IIIc стадию заболевания (Рисунок 7а). У 9 (17,7%) больных в процессе обследования установлена IV стадия серозного high-grade РЯ (цитологически верифицированный метастатический плеврит). Средний возраст пациенток этой подгруппы составил  $53,5 \pm 10,52$  года.

В подгруппу IB вошли 20 пациенток с low-grade СКЯ, 16 (80%) из которых имели IIIc стадию, 4 (20%) — IV стадию заболевания (Рисунок 7б). Средний возраст пациенток этой подгруппы составил  $57 \pm 9,26$  года.

По результатам морфологического исследования операционного материала пациенток I группы (n=71) были выявлены различные варианты морфологического строения эндометрия (Рисунок 8):

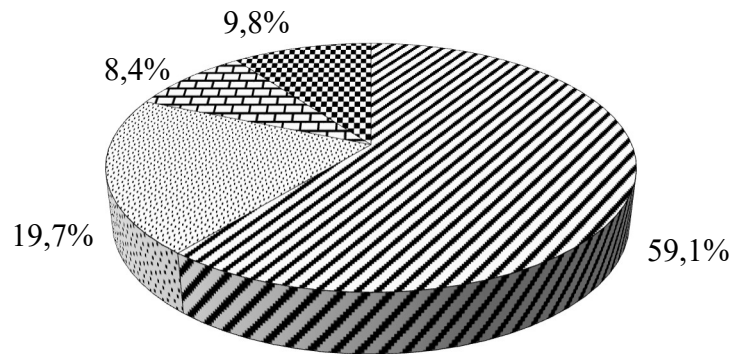
- атрофичный эндометрий (n=44; 59,1%);
- простая железистая гиперплазия без атипии (n=14; 19,7%);
- сложная железистая гиперплазия без атипии (n=6; 8,4%);
- эндометрий нормального строения (n=7; 9,8%).



**Рисунок 7** — Распределение пациенток группы I по клинической стадии: а — high-grade рак яичников (подгруппа IA); б — low-grade рак яичников (подгруппа IB)

Во II группу были включены пациентки с метастатическим поражением яичников из другого первичного очага (n=50). Средний возраст больных составил 53,66±8,92 года. В данную группу были включены пациентки с карциномами молочной железы (n=15; 30%), желудка (n=6; 12%), толстой кишки (n=9; 18%), поджелудочной железы (n=8; 16%) и почки (n=2; 4%).

Морфологическая картина эндометрия в данной группе исследуемых, как и в группе больных доброкачественными опухолями яичников, оценивалась в результате гистологического исследования операционного материала (в тех случаях, когда объем операции включал в себя гистерэктомию) или, когда хирургическое лечение ограничивалось аднексэктомией, пациенткам производилась аспирационная биопсия эндометрия с применением зонда типа Пайпель. У 31 пациентки (61%) эндометрий был атрофичным, простая железистая гиперплазия наблюдалась у 6 больных (12%), сложная железистая гиперплазия —



- ▣ Атрофичный эндометрий (n=44)
- ▣ Простая железистая гиперплазия без атипии (n=14)
- ▣ Сложная железистая гиперплазия без атипии (n=6)
- ▣ Эндометрий нормального строения (n=7)

**Рисунок 8** — Морфологическое строение эндометрия по результатам гистологического исследования операционного материала пациенток группы I серозных карцином яичников

у 3 (6%) и у 10 (20%) пациенток эндометрий имел нормальное строение. Следует отметить, что в данную группу не были включены пациентки, получавшие в процессе гормонотерапию ингибиторами ароматазы, антиэстрогенами или аналогами ГРГ.

III группа — 50 пациенток с доброкачественными опухолями яичников в возрасте от 31 до 77 лет (в среднем  $51,7 \pm 10,18$  лет) с морфологически подтвержденной серозной папиллярной цистаденомой (n=15; 30%), муцинозной цистаденомой ((n=13; 26%), зрелой тератомой (n=8; 16%), текомой (n=8; 16%), эндометриоидная цистаденома (n=6; 12%). Эндометрий в наибольшем количестве наблюдений был атрофичным (n=27; 54%), сложная гиперплазия без атипии была выявлена у 3 пациенток (6%), у остальных 20 (40%) испытуемых эндометрий имел нормальное строение.

В IV группу (контрольную) вошли 50 здоровых женщин-добровольцев в возрасте от 32 до 74 года (в среднем  $55,5 \pm 10,07$  лет).

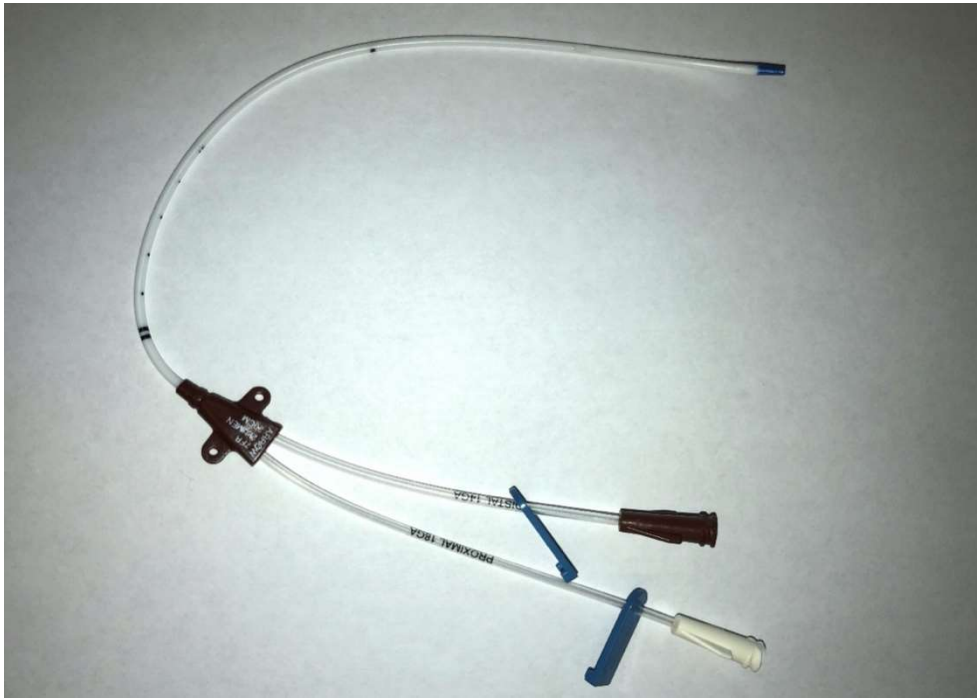
Особенности акушерско-гинекологического анамнеза пациенток, вошедших в исследование, представлены в таблице 2 и характеризуются наличием ранее перенесенных воспалительных заболеваний придатков (сальпингит, сальпингоофорит, пиосальпингс) в 24,5% наблюдений, эрозии шейки матки — 25,1%, миомы матки — в 25,7%, эндометриоза — в 20,4%, а также сочетания эндометриоза и миомы матки — 16,9%.

**Таблица 2** — Характеристика акушерско-гинекологического анамнеза исследуемых больных

<b>Гинекологическая патология в анамнезе</b>	<b>I группа (n=71)</b>	<b>II группа (n=50)</b>	<b>III группа (n=50)</b>	<b>Итого (n=171)</b>
Воспалительные заболевания придатков (аднексит, сальпингит, сальпингоофорит)	28 (39,4%)	6 (12%)	8 (16%)	42 (24,5%)
Эрозия шейки матки	26 (36,6%)	6 (12%)	11 (22%)	43 (25,1%)
Эндометриоз	18 (25,3%)	9 (18%)	8 (15%)	35 (20,4%)
Миома матки	21 (29,5%)	7 (12%)	16 (32%)	44 (25,7%)
Сочетание эндометриоза и миомы матки	15 (21,1%)	5 (10%)	9 (18%)	29 (16,9%)
Бесплодие	14 (19,7%)	4 (8%)	5 (10%)	23 (13,4%)
Привычное невынашивание беременности	2(2,8%)	1 (2%)	-	3 (1,75%)

### **2.3 Методика аспирации содержимого из полости матки**

Для получения наиболее информативного материала из полости матки методика аспирации образцов клеток из последней была усовершенствована нами с помощью применения двухпросветного центрального венозного катетера REFCV-17702-E фирмы Arrow International Inc., США (Рисунок 9).



**Рисунок 9** — Двухпросветный центральный венозный катетер REFCV-17702-E фирмы Arrow International Inc. (США)

В амбулаторных условиях при визуализации шейки матки в зеркалах после обработки влагалища водным раствором хлоргексидина для удобства манипуляций последняя фиксировалась пулевыми щипцами. Затем через цервикальный канал в полость матки вводился двухпросветный силиконовый катетер, к которому подсоединялись два шприца объемом 20 мл, один из которых был наполнен 0,9% раствором хлорида натрия. После введения катетера в полость матки (что достоверно определялось введением его на глубину до советующей заводской маркировке на его поверхности) производилось медленное введение физиологического раствора из подключенного к катетеру шприца с одномоментной аспирацией полученного материала в пустой. Материал помещали в эппендорф-пробирку с питательной средой и доставляли в лабораторию. Таким образом, в отличии от аспирации содержимого полости матки с применением урологического зонда типа Пайпель, данный метод позволил нам изучить практически весь клеточный состав содержимого полости матки, минимизируя содержание в нем форменных элементов крови и пластов клеток эндометрия.

## 2.4 Алгоритм определения экспрессии маркеров p53, p16, WT1 в аспирационном материале из полости матки

В рамках нашей научной работы проведено 221 цитологическое и 663 ИЦХ исследования образцов аспирационного материала из полости матки. На первом этапе полученный материал подвергался рутинному цитологическому исследованию с целью выявления в образце клеток карциномы, после чего выполнялось ИЦХ исследование на маркеры p53, p16, WT1: были заготовлены цитоспиновые многослойные препараты системы Cytospin — серия многослойных цитопрепаратов на центрифуге Cytospin — 3 в режиме 1000 г/мин в течение 5 минут. Два мазка окрашивали по Лейшману, на 3-х проводили ИЦХ исследование с моноклональными антителами (МКАТ) к p53, p16, WT1 (Таблица 3).

**Таблица 3** — Характеристика МКАТ, использованных для проведения иммуноцитохимического анализа аспирационного материала из полости матки

МКАТ	Клон	Разведение
p53	DO-7	1:25-1:50
p16	E6H4	1:25-1:50
WT1	6F-H2	1:75-1:150

Остальные препараты фиксировали в химически чистом ацетоне при температуре +4 – +8 °С и архивировали при –20 °С, предварительно завернув в фольгу. Процедура ИЦХ окрашивания производилась с применением автоматизированной системы BenchMark ULTRA (иммуногистостейнер Ventana). Все препараты докрасивали гематоксилином Майера в течение 30 секунд и заключали в бальзам. Оценка экспрессии маркеров в полученном материале проводилась качественно: ядерная реакция проявлялась разной степенью интенсивности и полнотой коричневого окрашивания ядра. Схема оценки степени выраженности экспрессии того или иного маркера была следующей: отрицательная реакция трактовалась как полное отсутствие или экспрессия антигена менее чем в

5% ядер опухолевых клеток, слабоположительная – при наличии реакции в 6–25% ядер, умеренно положительная в 26–75%, выраженная — более чем в 75% ядер. За положительный результат принята экспрессия маркера с умеренной и выраженной интенсивностью окраски ядра (Таблица 4).

**Таблица 4** — Схема оценки ИЦХ реакции с МКАТ к p53, p16, WT1

<b>Результат ИЦХ реакции</b>	<b>Экспрессия маркеров</b>	<b>Количество окрашенных ядер в поле зрения</b>
Отрицательный	Отрицательная	Полное отсутствие окрашенных ядер или окрашивание менее 5% ядер клеток
	Слабо положительная	Наличие реакции в 6–25% ядер клеток
Положительный	Умеренно положительная	Наличие реакции в 26–75% ядер клеток
	Выраженная	Более чем в 75% ядер клеток

## **2.5 Характеристика методов статистической обработки**

В результате отбора пациенток из данных амбулаторных карт и историй болезни была сформирована база исследования с использованием стандартного пакета программ Microsoft Excel для Windows 2007.

Статистический анализ полученных в ходе исследования данных и построение диаграмм выполнен с помощью программ STATISTICA 8 (Stat Soft Inc, США) и Med Calc для Windows, version 15.1 (Med Calc Software, Бельгия).

Распределение количественных (параметрических) переменных на нормальность проверена с помощью критерия Колмогорова–Смирнова с дополнительной оценкой асимметрии, эксцесса и гистограмм. При нормальном распределении значения количественных (параметрических) переменных представлены как среднее и стандартное отклонение ( $M \pm SD$ ). При распределении, отличном от нормального, значения количественных переменных представлены в виде медианы ( $Me$ ) и межквартильного интервала ( $Q_1-Q_3$ ).

При проверке статистических гипотез о наличии взаимосвязи между переменными и изучении частот непараметрических переменных нами был использован критерий  $\chi^2$  (Пирсона) с указанием его значения и уровня значимости ( $p$ ) для двустороннего (асимптоматического) теста. Межгрупповые различия изучены с помощью критерия Стьюдента (для количественных переменных в случае нормального распределения), U-критерия Манна-Уитни (для количественных переменных при отличном от нормального распределения и для непараметрических переменных).

Статистический анализ эффективности использования различных комбинаций маркеров, а также цитологического метода производился путем построения логистических регрессионных моделей с последующим ROC-анализом.

На основании полученных данных произведен расчет основных показателей эффективности цитологического и ИЦХ методов исследования: определена чувствительность, специфичность, прогностическая ценность положительного результата, прогностическая ценность отрицательного результата, диагностическая точность. При расчете вышеперечисленных показателей учитывались истинно положительные (ИП), истинно отрицательные (ИО), ложноположительные (ЛП) и ложноотрицательные (ЛО) результаты в отношении серозного рака яичников цитологические и ИЦХ значения. Расчет показателей производился по формулам:



$$\text{Чувствительность} = \frac{\text{ИП}}{\text{ИП}+\text{ЛО}} \times 100\%, \quad (1)$$

$$\text{Специфичность} = \frac{\text{ИО}}{\text{ИО}+\text{ЛП}} \times 100\%, \quad (2)$$

$$\text{Предсказательное значение положительного теста} = \frac{\text{ИП}}{\text{ИП}+\text{ЛП}} \times 100\%, \quad (3)$$

$$\text{Предсказательное значение отрицательного теста} = \frac{\text{ИО}}{\text{ИО}+\text{ЛО}} \times 100\%, \quad (4)$$

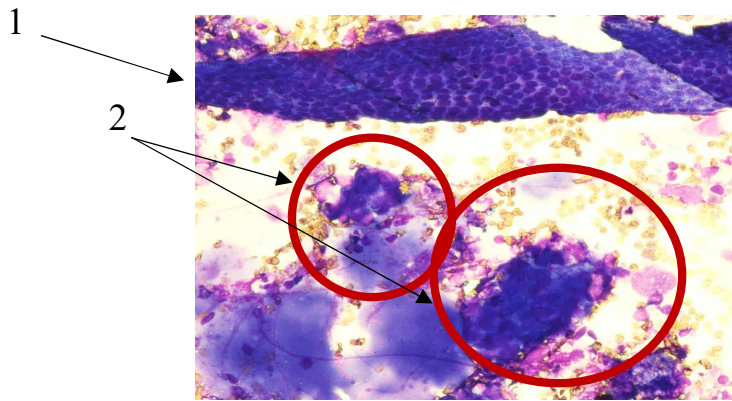
$$\text{Диагностическая точность} = \frac{\text{ИП}+\text{ЛО}}{\text{ИП}+\text{ЛП}+\text{ИО}+\text{ЛО}} \times 100\%, \quad (5)$$

Нулевая гипотеза отвергалась при уровне значимости  $p < 0,05$  [5]

## ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 3.1 Результаты цитологического и иммуноцитохимического исследования аспирационного материала больных серозным раком яичников

При рутинном цитологическом исследовании аспирационного материала из полости матки больных серозным high-grade РЯ единичные клетки соответствующей карциномы или их комплексы были выявлены у 33 пациенток, что составило 64,7% (Рисунок 10). В остальных 28 наблюдениях high-grade серозных карцином клеток рака в аспирационном материале, как и положительных реакций с МКАТ к p53, p16, WT1, выявлено не было.

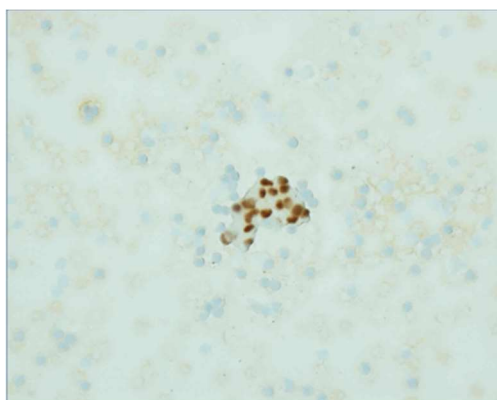


**Рисунок 10** — Цитопрепарат аспирационного материала из полости матки пациентки из группы high-grade серозного рака яичников: 1 — пласт клеток эндометрия, 2 — клетки, подозрительные в отношении серозной карциномы ( $\times 200$ )

При ИЦХ исследовании в 31 наблюдении (61%) прослеживалась выраженная или умеренная ядерная экспрессия белка p53 (Рисунок 11), ядерная экспрессия WT1 в 24 из 51 (47%) образцах, ядерная экспрессия p16 в 25 из 51 (49%).

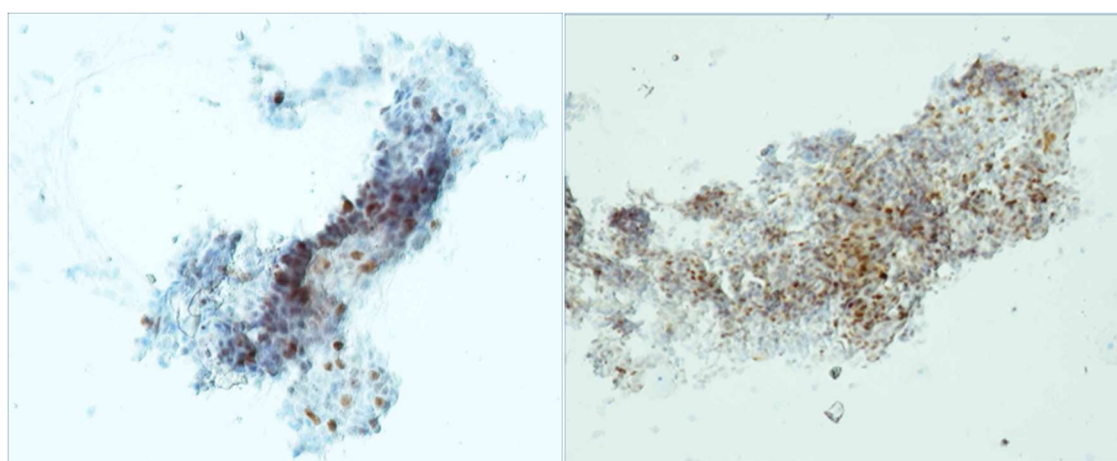
Рассматривая комбинацию всех трех маркеров, стоит отметить, что положительная экспрессия p53, p16, WT1 прослеживается у 17 пациенток, в материале которых при световой микроскопии были выявлены железисто-папиллярные комплексы, что составило 33% от их общего количества исследуемых

в группе high-grade карцином (n=51). Отрицательная реакция всей комбинации маркеров отмечена у 16 пациенток этой группы, что обусловлено, вероятно, в первую очередь отсутствием злокачественных клеток в полученном материале.



**Рисунок 11** — Характерные папиллярные структуры серозного рака high-grade. Ядерная экспрессия p53. Препарат Cytospin. Окраска по Лейшману (×200)

В единичных клетках пролиферирующего эндометрия в образцах аспирационного материала 4-х больных группы high-grade карцином отмечена ядерная экспрессия белка p53 и p16 на фоне отрицательной реакции WT1 и отсутствии морфологических признаков атипии (Рисунок 12).



*a*

*б*

**Рисунок 12** — Ядерная экспрессия белка p16 (а) p53 (б) в клетках неизмененного эндометрия пациентки IV группы (контрольной). Окраска по Лейшману (×200)

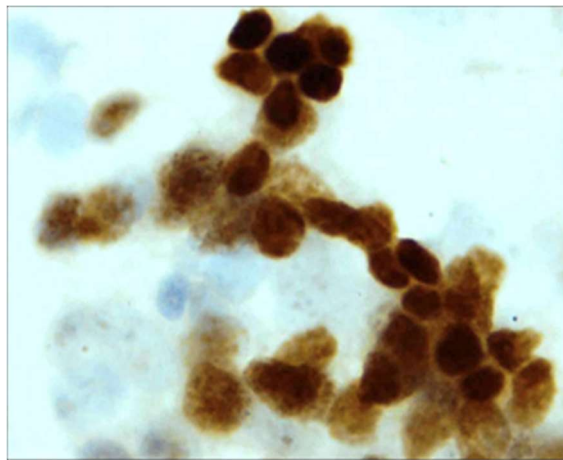
При тщательном морфологическом исследовании операционного материала этих пациенток в эндометрии выявлена сложная гиперплазия без атипии. Таким образом, возможно выдвинуть предположение, что положительная экспрессия p53 и p16 в этих наблюдениях может свидетельствовать о проявлении самых ранних молекулярных механизмов малигнизации эпителия эндометрия.

Из 20 больных low-grade карциномами у 12 пациенток (60%) при цитологическом исследовании аспирационного материала из полости матки были выявлены единичные клетки карциномы или их комплексы, что подтвердилось и при ИЦХ исследовании полученного материала. Выраженная ядерная экспрессия WT1 прослеживалась в этих же 12 образцах, в то время как реакция с МКАТ к белку p53 была слабой или умеренной и наблюдалась лишь в образцах 2-х пациенток. Ядерная экспрессия p16 прослеживается в образцах 3х больных. В аспирационном материале 8 (40%) больных low-grade карциномами клеток рака выявлено не было (Таблица 5).

**Таблица 5** — Сравнительная характеристика экспрессии маркеров p53, p16, WT1 в аспирационном материале из полости матки больных различных подтипов серозного рака яичников IIIc–IV стадии

Гистологический подтип серозного рака яичников	Цитологическое исследование образцов		ИЦХ исследование образцов		
	Клетки рака выявлены	Клетки рака не выявлены	p53	p16	WT1
High-grade (n=51)	33 (64,7%)	28 (36,3%)	31 (61%)	25 (49%)	24 (47%)
Low-grade (n =20)	12 (60%)	8 (40%)	2 (10%)	3 (15%)	12 (60%)
Итого (n=71)	45(63,4%)	36 (50,7%)	33 (46,5%)	28 (39,4%)	36 (25,6%)

Слабая ядерная экспрессия белка p53 в отдельных клетках эндометрия без признаков атипии при отсутствии в исследуемом материале клеток серозной карциномы зафиксировано у 2-х (10%) пациенток группы low-grade карцином. При морфологическом исследовании эндометрия в последнем патологии не выявлено. В 7 (35%) наблюдениях в полученном материале присутствуют комплексы клеток карциномы сосочкового строения с выраженной экспрессией WT1 на фоне отрицательной реакции с МКАТ к p16 (Рисунок 13).



**Рисунок 13** — Ядерная экспрессия WT1 в комплексах клеток карциномы, выявленных в аспирационном материале из полости матки больной low-grade серозным раком яичников (x1000)

Экспрессия p53 в этих комплексах не выявлена. Можно предположить, что положительная реакция WT1 указывает только на принадлежность комплексов клеток рака к серозному типу аденокарцином. У 3х (15%) больных в аспирационном материале из полости матки выявлены комплексы клеток рака с выраженной ядерной экспрессией WT1 в сочетании с ядерной экспрессией p16 (WT1+/p16+), что позволяет предположить принадлежность к low-grade подтипу серозных карцином.

### 3.2 Результаты цитологического и иммуноцитохимического исследования аспирационного материала больных с метастатическим поражением яичников, доброкачественными опухолями яичников и испытуемых контрольной группы

В 48 (96%) наблюдениях метастазов в яичниках (карцином кишки, почки, молочной железы, желудка и поджелудочной железы) при цитологическом исследовании аспиратов у больных клеток рака выявлено не было. Только в одном наблюдении у пациентки с метастазом колоректального рака в яичник в аспирате из полости матки выявили клетки аденокарциномы эндометриоидного типа, хотя данных о наличии эндометриоза у больной не было. Последняя находка подтвердилось при ИЦХ исследовании выраженной положительной экспрессией белка p53 (Таблица 6).

**Таблица 6** — Результаты цитологического и иммуноцитохимического исследования аспирационного материала пациенток с метастатическим поражением яичников

Локализация первичного очага рака	Количество образцов	Цитологическое исследование образцов		ИЦХ исследование образцов		
		Клетки рака выявлены	Клетки рака не выявлены	p53	p16	WT1
Молочная железа	15	-	14 (100%)	1	-	-
Желудок	6	-	6 (100%)	-	-	-
Толстая кишка	9	1 (11%)	8 (89%)	1	-	-
Почка	2	-	2 (100%)	-	-	-
Поджелудочная железа	8	-	8 (100%)	-	-	-
Итого	48			2	-	-

У одной из пациенток с метастазом РМЖ в яичнике в аспирате из полости матки определялись псевдопапиллярные скопления эпителиальных клеток без

выраженных признаков злокачественности, подозрительные в отношении пограничной опухоли яичников. При ИЦХ исследовании отмечалась умеренная положительная реакция белка p53 в 10% опухолевых клетках и высокий индекс пролиферативной активности (Ki67 = 65%).

При классическом цитологическом исследовании аспиратов из полости матки у 50 пациенток с доброкачественной патологией яичников атипических клеток в материале не найдено. В двух наблюдениях серозной цистаденомы яичников при ИЦХ анализе выявлена умеренная экспрессия p53 в части клеток эндометрия, причем в одном из них отмечалась умеренная экспрессия p16 и высокий индекс Ki67 (50%), при отсутствии экспрессии WT1. Выраженная экспрессия p16 в отдельных скоплениях клеток эндометрия сосочкового строения при отсутствии экспрессии других маркеров выявлена у пациентки с муцинозной цистаденомой яичников (p53-/WT1-). Индекс пролиферативной активности в клетках эпителия эндометрия при доброкачественных опухолях яичников варьировал в пределах 1–15%.

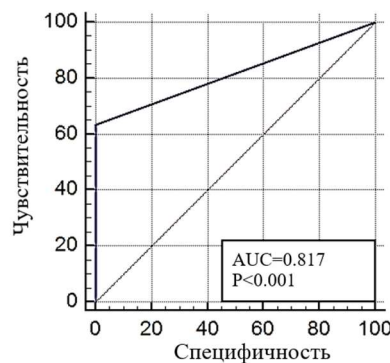
В группу IV (контрольную) вошли 50 практически здоровых женщин-добровольцев, проходивших профосмотр. При цитологическом исследовании клеточного состава аспиратов из полости матки у всех женщин, не имеющих в анамнезе патологии со стороны гинекологической сферы, клеток рака не было выявлено. Проведено ИЦХ исследование с антителами к антигенам WT1, p53, p16: экспрессия WT1 была отрицательной во всех 50 наблюдениях, положительная ИЦХ реакция с p16 отмечалась в 3 исследованиях, но имела слабовыраженную экспрессию в единичных клетках подтвержденного в дальнейшем гистологически пролиферирующего эндометрия. Экспрессия p53 была отрицательной у 49 женщин, и только в одном наблюдении отмечена слабая очаговая экспрессия белка p53 в клетках эпителия эндометрия. При динамическом наблюдении в течении нескольких лет, методом аспирационной биопсии гистологически были диагностированы: в 3 наблюдения простой железистой гиперплазии эндометрия, в

2 — атипическая гиперплазия, 1— вариант аденомиоза. У остальных 45 обследуемых отмечены варианты физиологического состояния эндометрия.

### **3.3 Анализ показателей диагностической информативности цитологического и ИЦХ исследования маркеров p53, p16, WT1 и их комбинации в аспирационном материале из полости матки больных СКЯ**

#### **3.3.1 Анализ показателей диагностической информативности цитологического метода исследования**

При оценке эффективности цитологического метода с применением жидкостной цитологии и системы Cytospin для исследования аспирационного материала из полости матки в диагностике серозных карцином яичников, установлено что, чувствительность диагностического метода не столь высока и составляет 63,3% при высокой специфичности, достигающей 99% (Рисунок 14).



**Рисунок 14** — ROC - кривая для цитологического метода, основанного на применении жидкостной цитологии и системы Cytospin для исследования аспирационного материала из полости матки в диагностике серозных карцином яичников

Прогностическая ценность положительного результата при этом высока и составляет 99%, в то время как прогностическая ценность отрицательного результата 65,8%. Диагностическая точность метода составляет 78,5%. При сравнении группы больных СКЯ (n=71) с группой больных доброкачественными опухолями (n=50), группой больных с метастатическим поражением яичников (n=50) и группой контроля (n=50) установлено, что в обоих случаях



цитологический метод исследования аспирационного материала из полости матки может применяться в качестве дополнительного метода для проведения дифференциальной диагностики новообразований яичников: данные ROC-анализа практически идентичны и AUC (area under curve, площадь под кривой ошибок) составляет 0,817.

### ***3.3.2. Анализ результатов ИЦХ метода исследования аспирационного материала из полости матки в диагностике серозных карцином яичников***

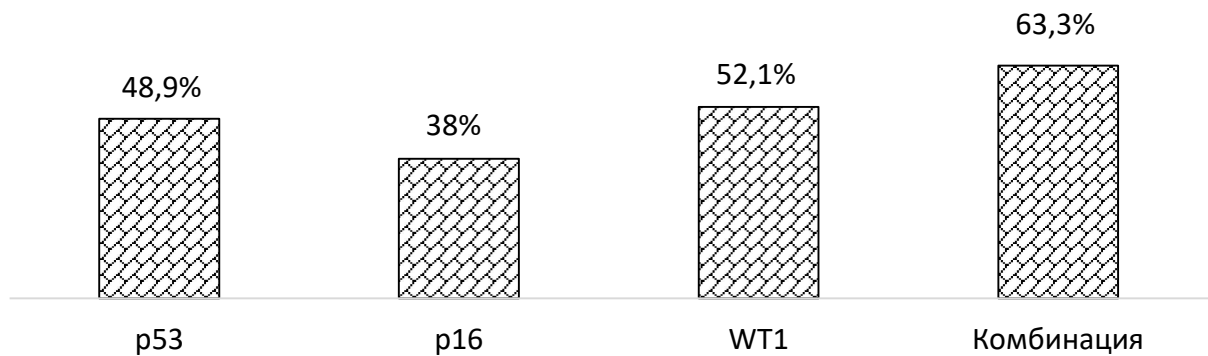
Оценка экспрессии маркеров p53, p16, WT1 в аспирационном материале из полости матки выполнялась у всех пациенток исследуемых групп, различия в экспрессии являются статистически значимыми ( $p < 0,0001$ ). Сводные данные о показателях диагностической информативности маркеров и их комбинации представлены в таблице 7. Рассмотрим подробнее каждый из них.

**Таблица 7** — Показатели диагностической информативности ИЦХ метода исследования маркеров p53, p16, WT1 и их комбинации в диагностике серозных карцином яичников

<b>Показатель</b>	<b>p53</b>	<b>p16</b>	<b>WT1</b>	<b>Комбинация</b>
Чувствительность, %	47,89	38,03	52,11	63,38
Специфичность, %	98,00	94,00	100,00	98,00
Прогностическая ценность положительного результата, %	97,14	90,00	100,0	97,80
Прогностическая ценность отрицательного результата, %	57,0	51,6	59,5	65,3
Диагностическая точность, %	68,60	61,16	71,90	77,69

Данные об уровне чувствительности ИЦХ исследования экспрессии маркеров и их комбинации в аспирационном материале из полости матки при серозном раке яичников обоих гистологических подтипов представлены на рисунке 15. При сравнении показателей диагностической информативности

маркеров и их комбинации для групп больных СКЯ (n=71) и метастатическим поражением яичников (n=50) установлено, что наибольшей чувствительностью обладает комбинация всех 3х маркеров, составляя 63,38%, а также маркер WT1, составляя 52,11% (Рисунок 15).

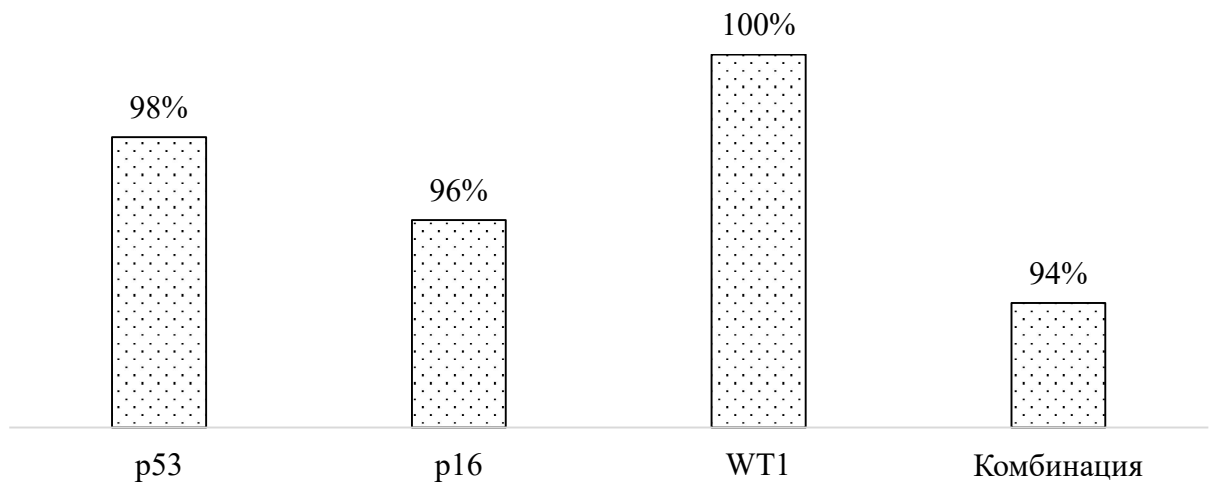


**Рисунок 15** — Чувствительность маркеров p53, p16, WT1 в аспирационном материале из полости матки у пациенток с серозным раком яичников III–IV стадии

Рассматривая различия в уровне показателя специфичности исследуемых маркеров и их комбинации нельзя не отметить, что согласно полученным нами данным специфичность маркера WT1 в группе больных серозными карциномами яичников достигает 100% — в образцах аспирационного материала из полости матки всех больных серозным раком яичников, включенных в настоящее исследование не выявлено ни одного ложно-отрицательного результата, то есть наличие экспрессии WT1 клетками карциномы в аспирате прослеживалось только у пациенток группы серозных карцином обоих гистологических подтипов.

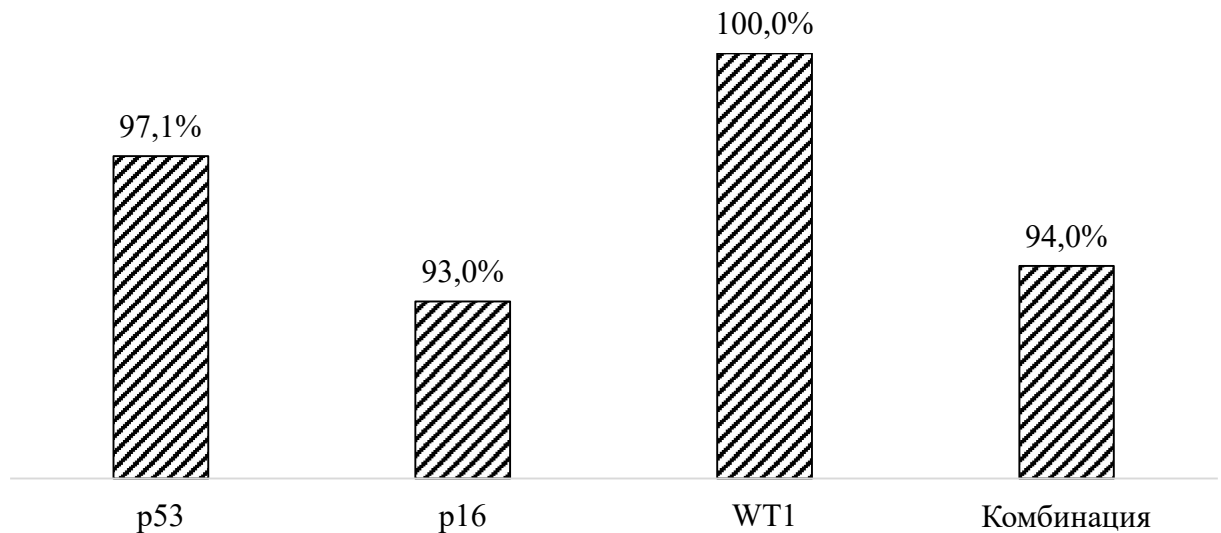
Учитывая данные логистической регрессии с последующим ROC-анализом для проведения дифференциальной диагностики между и high-grade и low-grade серозными карциномами яичников, первичным серозным раком яичников и метастатическим поражением придатков и доброкачественными опухолями

яичников, а также принимая во внимание, что исследуемый диагностический подход продемонстрировал достаточно высокую специфичность (Рисунок 16), на фоне не столь значительной чувствительности, чтобы рассматриваться в качестве скринингового метода диагностики серозных карцином яичников, наиболее целесообразно его внедрение в клиническую практику в качестве дополнительного, а не основного метода обследования при подозрении на СКЯ.

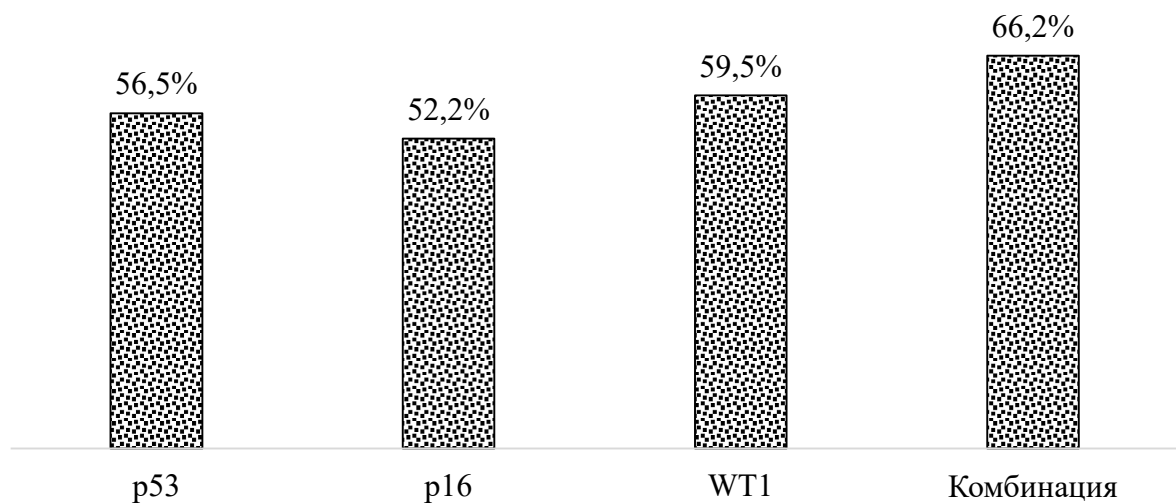


**Рисунок 16** — Специфичность маркеров p53, p16, WT1 и их комбинации в аспирационном материале из полости матки пациенток с серозным раком яичников III–IV стадии

На рисунках 17 и 18 представлены обобщенные данные о предсказательной ценности положительного и отрицательного результатов ИЦХ исследования маркеров p53, p16, WT1 и их комбинации в диагностике СКЯ. Согласно полученным нами данным наибольшей предсказательной ценностью положительного результата в группе СКЯ обладает маркер WT1, экспрессия которого во всех образцах, содержащих клетки аденокарциномы, свидетельствует о СКЯ.



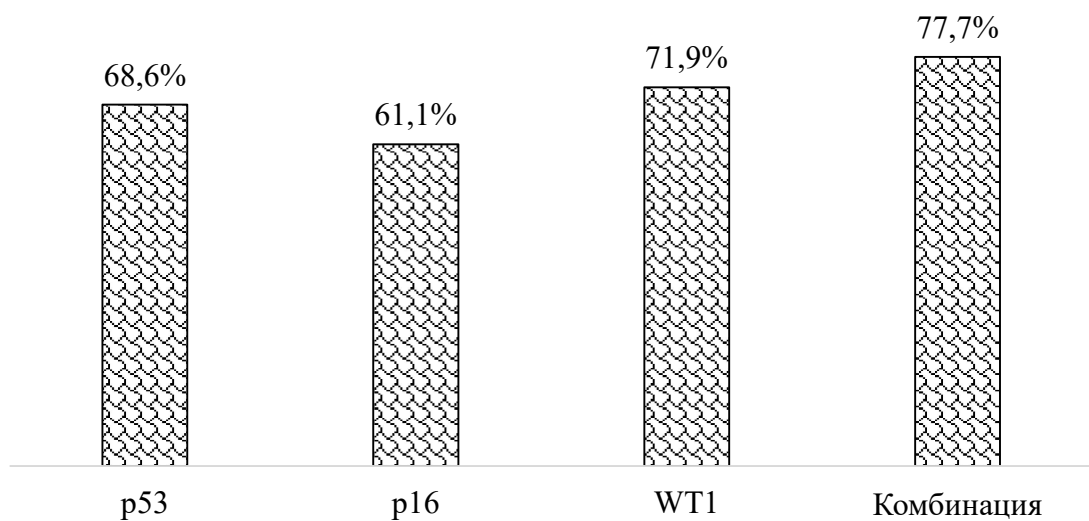
**Рисунок 17** — Предсказательная ценность положительного результата экспрессии маркеров p53, p16, WT1 в аспирационном материале из полости матки пациенток с серозным раком яичников III–IV стадии



**Рисунок 18** — Предсказательная ценность отрицательного результата экспрессии маркеров p53, p16, WT1 и их комбинации в аспирационном материале из полости матки больных серозным раком яичников III–IV стадии

Анализируя сравнительные данные о диагностической точности маркеров p53, p16, WT1 и их комбинации в диагностике СКЯ, представленных на рисунке

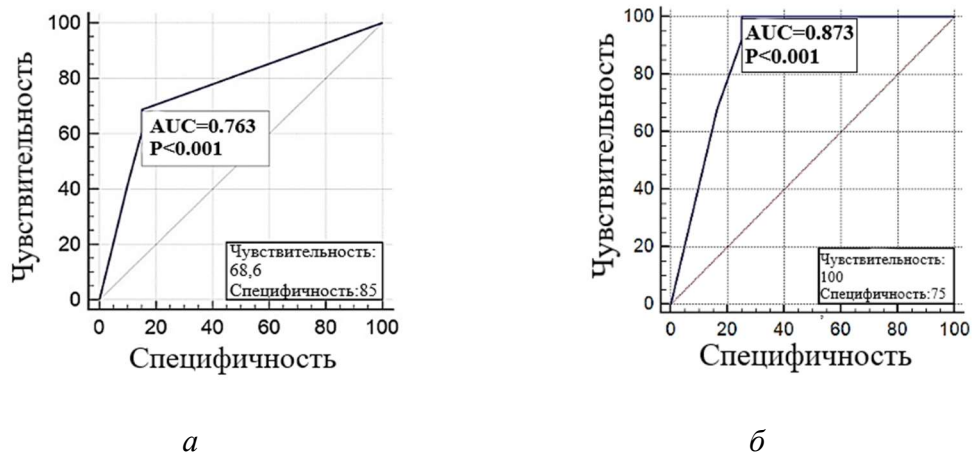
19, очевидным становится увеличение показателя при использовании всех трех маркеров по сравнению с каждым из них в отдельности. Наибольшей диагностической точностью обладает маркер WT1: при сравнении результатов ИЦХ исследования группы больных СКЯ (n=71) и с таковыми в контрольной группе установлено, что диагностическая точность последнего составляет 71,9%, в то время как значение этого показателя для маркера p53 составило 68,6%, p16 — 61,16%.



**Рисунок 19** — Диагностическая точность экспрессии маркеров p53, p16, WT1 в аспирационном материале из полости матки больных серозным раком яичников III–IV стадии

Обобщая вышеизложенное, становится очевидной необходимость оценки экспрессии маркеров p53, p16, WT1 именно в комбинации, причем на первом этапе ИЦХ исследования аспирата из полости матки при подозрении на СКЯ целесообразно оценить экспрессию WT1, что позволит установить принадлежность атипических клеток к серозному типу карцином, а анализ экспрессии маркеров p53 и p16 в образцах аспириатов больных позволяет предположить принадлежность конкретного наблюдения к подгруппе high-grade или же low-grade подтипов.

Кроме того, при построении логистической регрессионной модели с двумя маркерами p53 и p16 было установлено, что диагностическая значимость маркера p16 при отсутствии данных об экспрессии WT1 полностью утрачивается, а значение AUC составляет 0,763 (Рисунок 20а). Формирование выборки больных серьезными карциномами яичников с положительной экспрессией WT1 клетками карциномы и последующая оценка экспрессии маркеров p53 и p16 в ней приводит к увеличению AUC до 0,873 (Рисунок 20б).

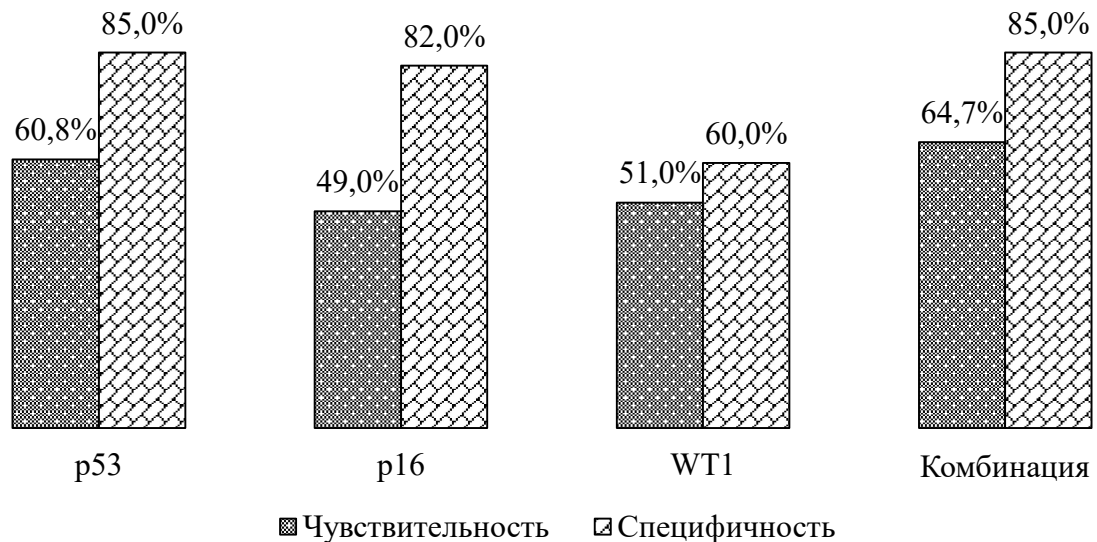


**Рисунок 20** — ROC-анализ (выборка больных СКЯ обоих гистологических подтипов): а — при оценке экспрессии p53 и p16 у пациенток СКЯ; б — при оценке экспрессии p53 и p16 у пациенток с СКЯ с положительной экспрессией WT1

Оценивая экспрессию маркеров p53 и p16 в аспирационном материале больных, у которых выявлены клетки карциномы с положительной ядерной экспрессией WT1, установлено, что использование этих двух маркеров одновременно только в группе испытуемых с положительным WT1-статусом повышает диагностическую чувствительность модели ( $p=0,05$ ). При этом предсказательная ценность положительного результата составляет 89,3%, а отрицательного — 99%. Из этого следует, что при анализе аспирационного материала из полости матки после установления факта наличия в нем клеток карциномы наиболее целесообразно оценивать экспрессию маркера WT1.

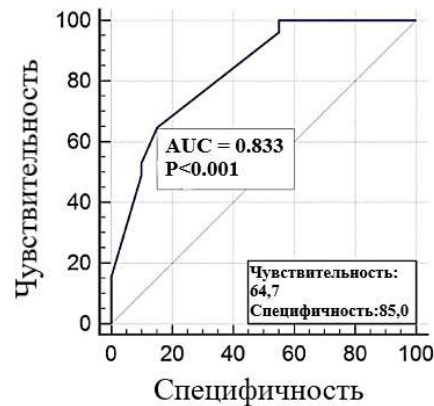
### 3.4 Анализ диагностической информативности ИЦХ исследования маркеров p53, p16, WT1 в аспирационном материале из полости матки маркеров p53, p16, WT1 в дифференциальной диагностике опухолей яичников

При расчете показателей диагностической информативности исследуемых маркеров в подгруппе больных СКЯ high-grade подтипа (n=51) при сравнении с группой low-grade (n=20), установлено, что диагностическая чувствительность всей комбинации маркеров в качестве метода дифференциальной диагностики составляет 64,7% при специфичности равной 85%. Анализ показателей этой подгруппы пациентов в сравнении с таковыми в подгруппе больных low-grade карциномами (n=20), продемонстрировал статистическую значимость различий между ними ( $p < 0,0001$ ). Сравнительные данные чувствительности и специфичности маркеров и их комбинации в диагностике high-grade карцином яичников представлены на рисунке 21.



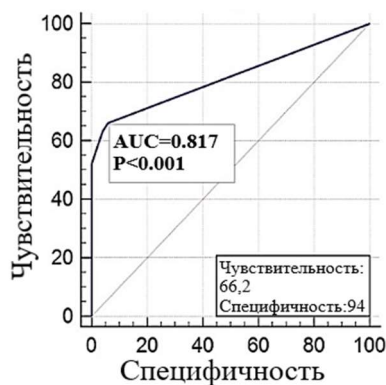
**Рисунок 21** — Показатели чувствительности и специфичности маркеров p53, p16, WT1 и их комбинации в диагностике high-grade подтипа СКЯ

При проведении ROC-анализа установлено, что метод применим в качестве дополнительного для проведения дифференциальной диагностики СКЯ high-grade и low-grade подтипов: значение AUC составляет 0,833 при  $p < 0,0001$  (Рисунок 22).

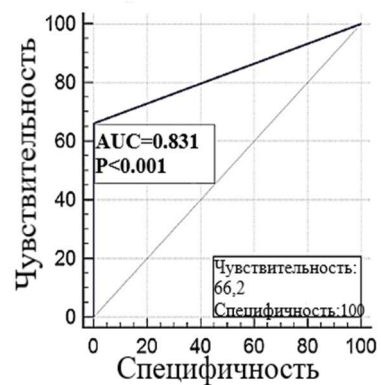


**Рисунок 22** — Кривая ROC-анализа информативности оценки экспрессии комбинации маркеров для дифференциальной диагностики high-grade и low-grade карцином

Кроме того, при проведении ROC-анализа экспрессии маркеров и их комбинации пациенток с СКЯ, доброкачественными опухолями яичников и с метастатическим поражением яичников было установлено, что в обоих случаях максимальное значение AUC достигается при оценке их комбинации и составляет 0,817 для группы доброкачественных опухолей и 0,831 для группы метастазов (Рисунок 23).



*а*



*б*

**Рисунок 23** — Кривая ROC-анализа информативности оценки экспрессии комбинации маркеров для дифференциальной диагностики: а – СКЯ и доброкачественных опухолей яичников; б – СКЯ и метастатическое поражение яичников



Таким образом, можно сделать вывод, что ИЦХ исследование экспрессии комбинации маркеров p53, p16, WT1 в аспирационном материале из полости матки может служить дополнительным методом для проведения дифференциальной диагностики опухолей яичников.

### **3.5 Описание клинических наблюдений**

#### **Клиническое наблюдение №1**

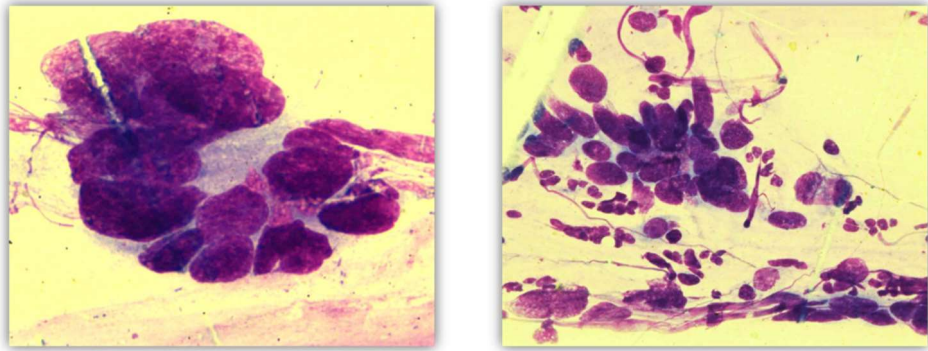
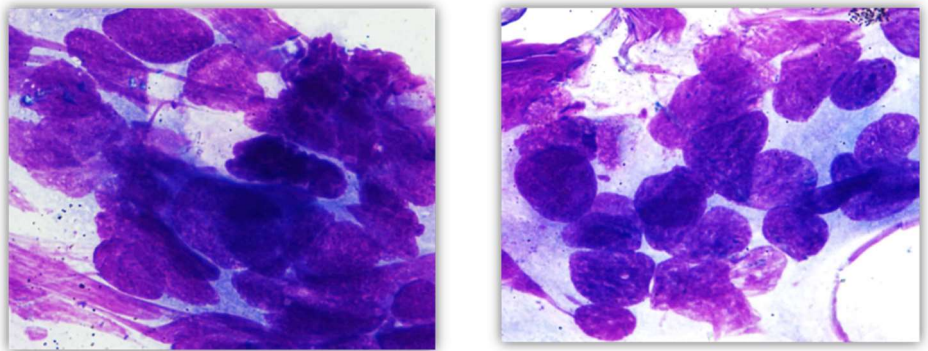
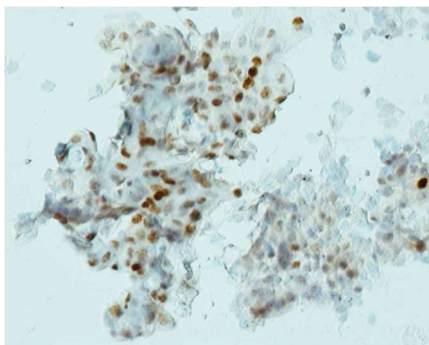
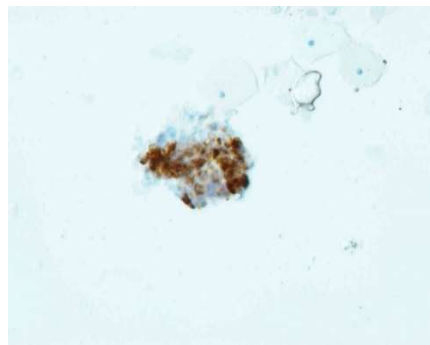
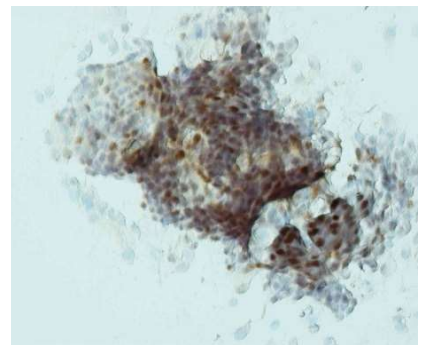
Пациентка Г., 58 лет.

Клинический диагноз: Рак маточной трубы T3cN0M0, IIIС стадии.

Сопутствующие заболевания: ИБС. Атеросклеротический кардиосклероз. Атеросклероз аорты. Гипертоническая болезнь 3 стадии, 3 степени. Риск ССО-3. Хронический бронхит. Пневмосклероз. Хронический вирусный гепатит С.

Анамнез заболевания: В декабре 2014 года стала отмечать увеличение живота в объеме, слабость. При обследовании по данным УЗИ от 25.02.2015г: асцит, утолщенный до 1,5 см большой сальник в виде «панциря». В малом тазу: брюшина инфильтрирована, утолщена до 0,8 см, тело матки не увеличено, 4,0×3,4×4,8 см, эндометрий не утолщен, шейка матки не увеличена, эндоцервикс не утолщен, определяются опухолево-измененные яичники с неровным бугристым контуром, солидной структуры размером справа 2,0×1,6 см, слева 2,2×2,0 см. Уровень маркера СА-125 от 11.03.2015 — 492,2 Ед/мл.

Цитологическое исследование №2015/3116 (Рисунок 24): мазок с экзоцервикса и из цервикального канала – в полученном материале среди клеток плоского эпителия определяются комплексы клеток, принадлежащие код: 8140 аденокарцинома метастатическая.

*a**б**p16**WT1**p53**в*

**Рисунок 24** — Цитологическое исследование мазков с экзоцервикса и из цервикального канала пациентки Г, 58 лет: а) комплекс клеток аденокарциномы в мазке с шейки матки, окраска по Лейшману,  $\times 200$ ; б) клетки, подозрительные в отношении аденокарциномы на фоне пластов клеток эндометрия (препарат Cytospin, окраска по Лейшману,  $\times 200$ ); в) ИЦХ исследование с МКАТ к p16, p53, WT1,  $\times 200$

Цитологическое исследование № 2015/2376: аспират из полости матки - в полученном материале код: 8140/6 аденокарцинома метастатическая (возможно яичников).

ИЦХ исследование № 2015/3398: при дополнительном ИЦХ исследовании аспирационного материала из полости матки выявлена положительная экспрессия p16, p53 и WT1 в клетках карциномы.

Гистологическое заключение после хирургического лечения в объеме пангистерэктомии, оментэктомии, забрюшинной лимфодиссекции: Серозная high-grade карцинома маточной трубы с распространением на оба яичника, множественными метастазами в большом сальнике и по брюшине.

### **Клиническое наблюдение №2**

Пациентка П., 44 года.

Клинический диагноз: Рак яичников T3cN1M0, IIIc стадии.

Сопутствующие заболевания: Артериальная гипотония. Аутоимунный тиреоидит.

Анамнез заболевания: При профилактическом осмотре гинекологом по месту жительства выявлены двусторонние объемные образования придатков.

Менархе в 14 лет, роды 1, в срок доношенной девочкой, аборт 1, выкидышей 0. Менструации регулярные, умеренные, безболезненные. На момент аспирации содержимого из полости матки — 10-й день менструального цикла. Семейный анамнез по онкологической патологии отягощен: мать — рак молочной железы и рак желудка, сестра матери — рак щитовидной железы.

По данным УЗИ ОМТ от 13.11.2015 г. яичники представлены многокамерными образованиями с множеством перегородок различной толщины, кровотоком в них, общим размером 153×107мм.

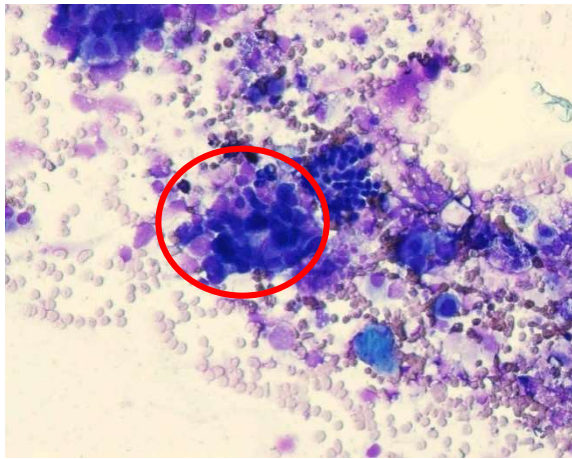
По данным МРТ ОБП и ОМТ при поступлении от 07.11.2015 г:

МР-признаки парааортальной лимфаденопатии. Наиболее крупный узел расположен над бифуркацией аорты справа размерами 10×15×18 мм, другие

парааортальные л\у до 6 мм в диаметре. Срединно в полости малого таза, от уровня L4 и до уровня верхнего края лонного сочленения, определяется неправильной формы кистозное-солидное образование размерами 160×100×115 мм. Множественные кистозные полости от 3 до 95 мм имеют высокий сигнал на T2, и сигнал разной интенсивности (гипер-изо-гипоинтенсивный) на T1, наиболее крупная киста диаметром 9,5 мм определяется в нижней части образования с наличием уровня более плотного содержимого толщиной до 10 мм. В структуре образования — неравномерной толщины перегородки, хаотично расположенные в виде узлов мягкотканые структуры, размером до 30 мм по левому контуру. Матка обычной формы, не увеличена. Уровень маркера СА-125 от 16.11.2015 — 236 Ед/мл.

По данным цитологического исследования (№2015\19782) аспирационного материала из полости матки в полученном материале среди пластов эндометрия определяются сосочкоподобные скопления относительно полиморфных клеток, подозрительных в отношении аденокарциномы (Рисунок 25а). При ИЦХ исследовании выявлена гиперэкспрессия p53 (Рисунок 25б), цитоплазматическая экспрессия WT1 (Рисунок 25в и Рисунок 25г) в клетках аденокарциномы, ядерная экспрессия p16 (Рисунок 25д). При цитологическом исследовании выпота из брюшной полости (№2015/20547) в полученном материале обнаруженные клетки соответствуют аденокарциноме, метастатической.

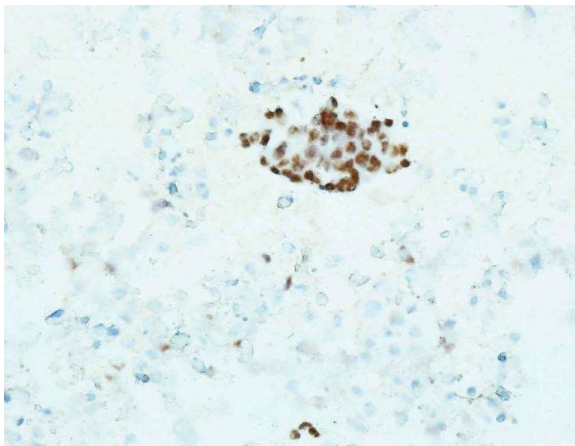
Выполнено хирургическое лечение в объеме лапаротомии, пангистерэктомии, оментэктомии, частичной перитонэктомии, забрюшинной лимфодиссекции. Гистологическое заключение операционного материала №44630/2015: в обоих яичниках разрастания серозной high-grade аденокарциномы, в большом сальнике, фрагментах брюшины и аортоковальных лимфатических узлах — метастазы опухоли аналогичного строения. Строение эндометрия соответствует фазе секреции.



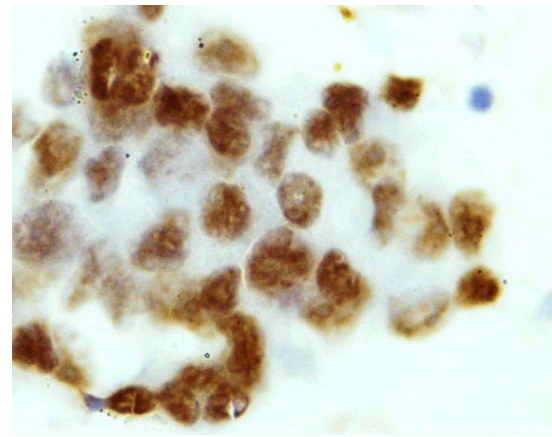
а



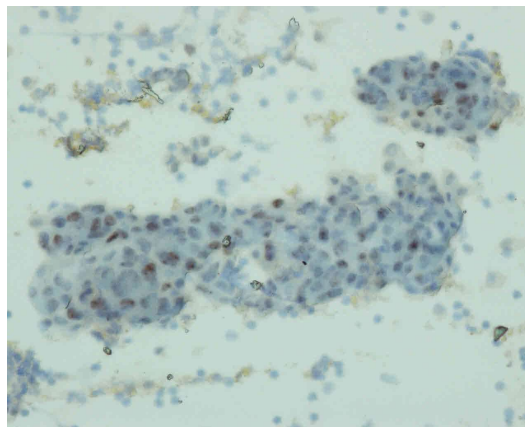
б



в



г



д

**Рисунок 25** — Цитологическое исследование аспирационного материала из полости матки пациентки П, 44 года: а) клетки, подозрительные в отношении аденокарциномы на фоне пластов клеток эндометрия (препарат Cytospin, окраска по Лейшману,  $\times 200$ ); б) гиперэкспрессия p53 в клетках карциномы ( $\times 200$ ); в, г) экспрессия WT1 в клетках карциномы ( $\times 200$ ,  $\times 1000$ ); д) диффузная ядерная экспрессия p16 в клетках карциномы ( $\times 200$ )

**Клиническое наблюдение №3**

Пациентка И., 57 лет

Клинический диагноз: Рак яичников T3cN0M0, IIIc стадии.

Сопутствующий диагноз: Пароксизмальная синусовая тахикардия.  
Хронический бронхит, вне обострения.

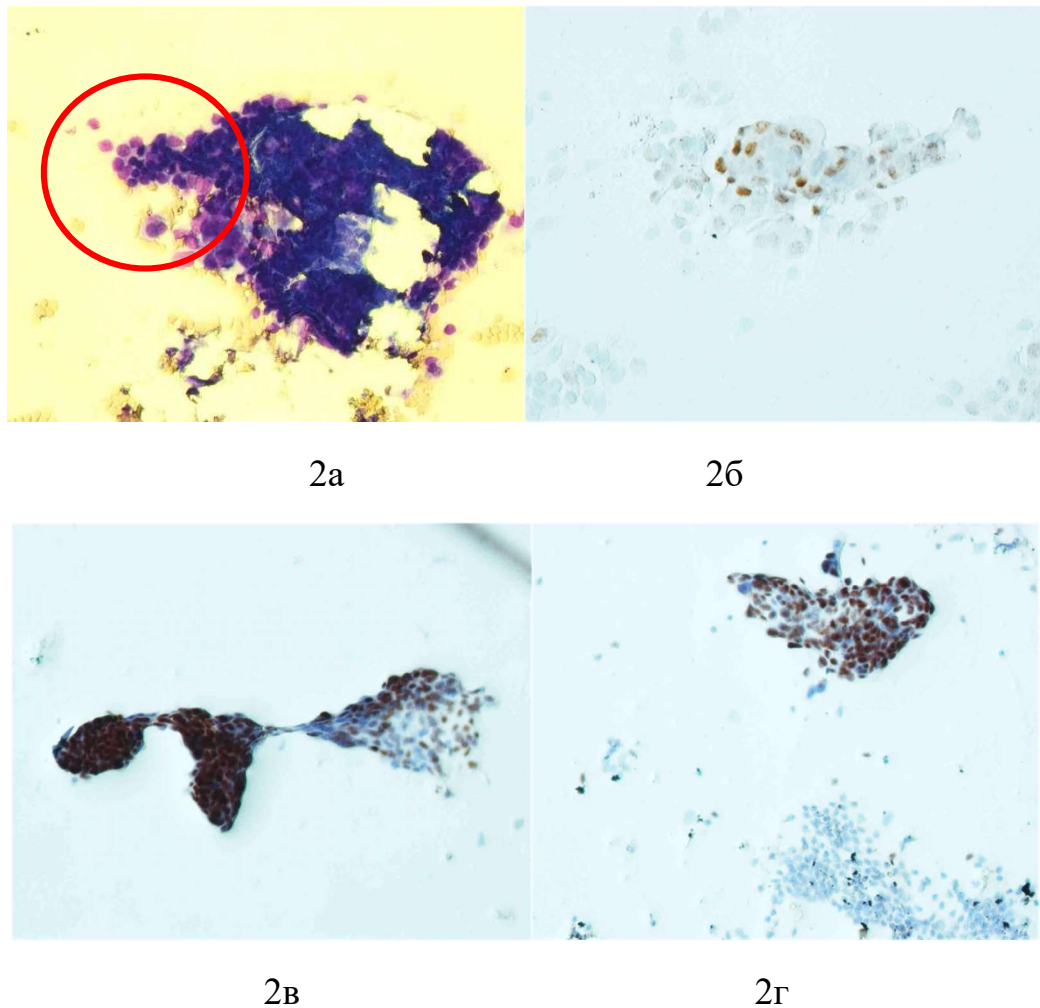
Анамнез заболевания: В 2015 году стала отмечать увеличение живота в объеме. При обследовании выявлена опухоль в брюшной полости, исходящая из малого таза, размерами 18×12×17 см.

Менархе в 14 лет, менструальная функция без особенностей. Менопауза с 50 лет. Беременностей — 2, роды — 1, аборт — 1. Семейный анамнез по онкологической патологии отягощен: мать – рак желудка.

По данным УЗИ ОМТ и ОБП при поступлении: в гипогастральной области определяется больших размеров объемное кистозно-солидное многокамерное образование, общими размерами до 18×12×17 см – опухолево измененный правый яичник. Левый яичник также опухолево изменен, представлен солидно-кистозным образованием размерами 5,6\*3,0 см. По брюшине малого таза — сливные диссеминаты толщиной 0,8 см и отдельные узлы диаметром до 2,5 см. В полости малого таза жидкость со взвесью, слоем до 3 см. Большой сальник утолщен до 2 см, с метастазами до 2,7 см в диаметре. Уровень маркера СА-125 от 08.12.2015 г. — 996 Ед/мл.

По данным цитологического исследования аспирационного материала из полости матки (№2015/19810): среди клеток эндометрия определяются единичные папиллярные комплексы гиперхромных клеток, вероятнее всего, соответствующие аденокарциноме (Рисунок 26а). При ИЦХ исследовании отмечается слабая диффузная экспрессия p53 в части ядер (Рисунок 26б), положительная экспрессия p16 и WT1 (Рисунок 26в, Рисунок 26г).

По данным цитологического исследования выпота из брюшной полости (№2015/21250) в полученном материале обнаруженные клетки соответствуют метастазу серозной аденокарциномы.



**Рисунок 26** — Цитологическое исследование выпота из брюшной полости пациентки И., 57 лет: а) среди клеток эпителия эндометрия определяются единичные папиллярные комплексы гиперхромных клеток, вероятнее всего соответствующие аденокарциноме (препарат Cytospin, окраска по Лейшману,  $\times 200$ ); б) слабая диффузная ядерная экспрессия p53 в клетках карциномы ( $\times 200$ ); в, г) экспрессия WT1 и p16 в клетках карциномы ( $\times 200$ )

Выполнено хирургическое лечение в объеме пангистерэктомии, оментэктомии, частичной перитонэктомии, забрюшинной лимфодиссекции. Гистологическое заключение операционного материала (№46829/2015): Опухоль яичников имеет строение серозного low-grade рака, с метастазами в большом сальнике. Эндометрий атрофичного вида.

**Клиническое наблюдение №4**

Пациентка К., 55 лет.

Клинический диагноз: Основной: Рак яичников T1cN0M0, IC стадии.

Сопутствующий диагноз: Варикозная болезнь вен нижних конечностей.

Анамнез заболевания: В 2014 году выявлена опухоль яичников при плановом медицинском обследовании. Менархе в 13 лет, менструальная функция без особенностей. Менопауза с 52 лет. Беременностей — 3, роды — 3, аборт — 0. Семейный анамнез по онкологической патологии неотягощен.

По данным УЗИ ОМТ и ОБП в брюшной полости опухоль размерами 17×15×10 см со множественными папиллярными разрастаниями по внутреннему контуру, исходящая из правых придатков матки. Из левого яичника исходит солидной структуры компонент с перегородками 6,2×5,2 см. Большой сальник не утолщен, брюшина без особенностей. Свободная жидкость в брюшной полости до 1 см. Уровень маркера СА-125 от 30.03.2015г. — 3500 Ед/мл.

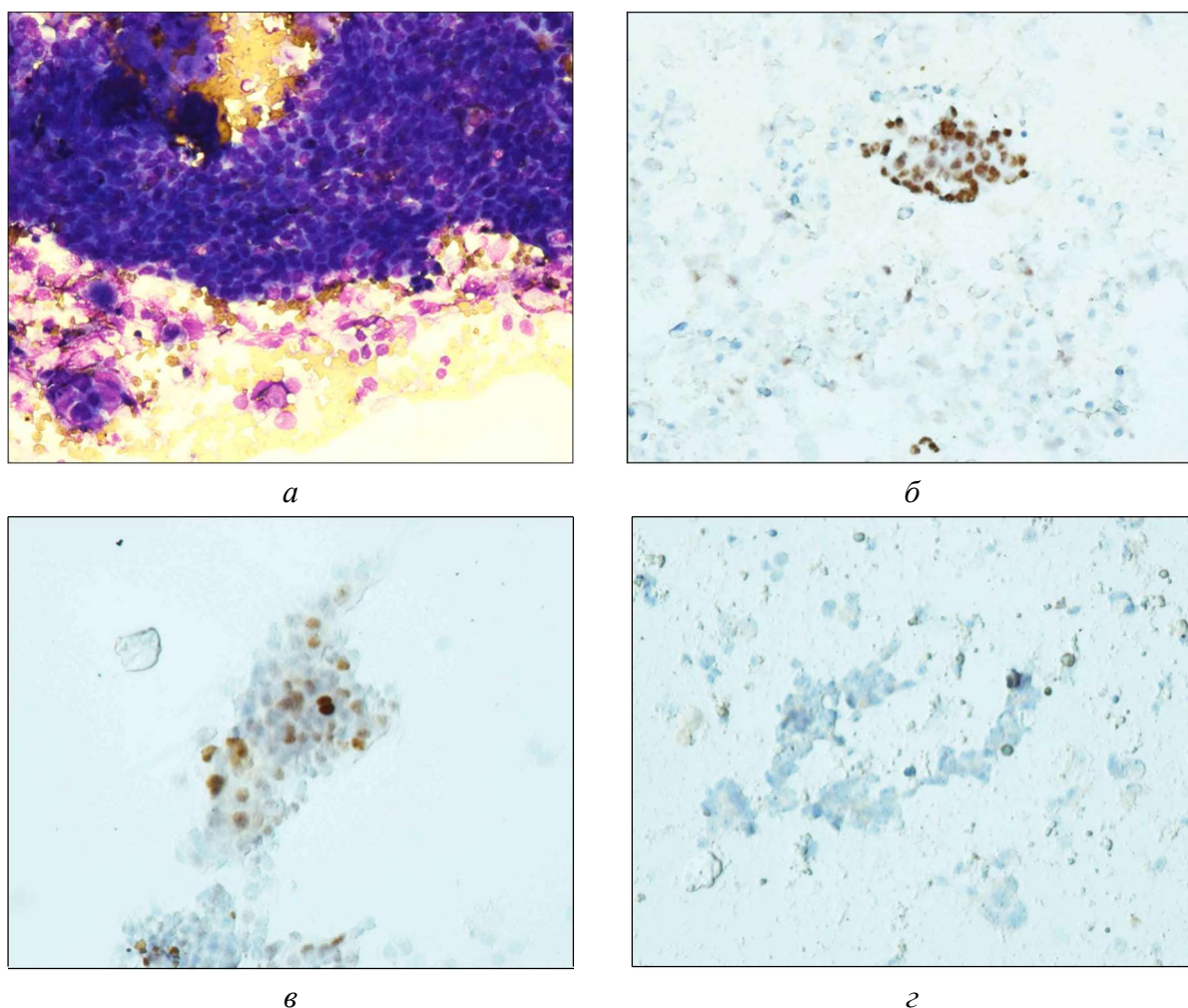
При цитологическом исследовании аспирата из полости матки (2015/4909) в полученном материале определяется единичный комплекс клеток, подозрительный в отношении аденокарциномы (Рисунок 27а). При проведении ИЦХ исследования выявлена положительная экспрессия WT1, положительная экспрессия p16 в части ядер, в то время как экспрессия p53 отрицательная (Рисунок 27б, Рисунок 27в, Рисунок 27г).

При цитологическом исследовании смывов с брюшины, полученных интраоперационно (№2015/5960), в полученном материале обнаружены аденогенные метастатические раковые клетки.

Выполнено хирургическое лечение в объеме пангистерэктомии, оментэктомии, множественной биопсии брюшины.

Гистологическое заключение операционного материала (№12372/2015): В яичниках среди участков серозной пограничной опухоли определяются множественные зоны разрастания low-grade серозного рака. Эндометрий атрофического вида.





**Рисунок 27** — Цитологическое исследование аспирата из полости матки пациентки К., 55 лет: а) среди клеток эпителия эндометрия определяются единичные папиллярные комплексы гиперхромных клеток, вероятнее всего соответствующие аденокарциноме ( препарат Cytospin, окраска по Лейшману,  $\times 200$ ); б) экспрессия WT1 в клетках карциномы ( $\times 200$ ); в) экспрессия p16 ( $\times 200$ ); г) отрицательная экспрессия p53 ( $\times 200$ )

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В структуре заболеваемости ЗНО женского населения в РФ по данным за 2018 год РЯ занимает 9-е место, в структуре смертности от ЗНО — 8-е [10]. Результаты лечения начальных и распространенных стадий РЯ, согласно которым 5-летняя выживаемость при I и II стадиях находится на уровне 80%, в противоположность III и IV стадиях, где этот показатель равен не более 30%, так же свидетельствуют в пользу необходимости разработки эффективных скрининговых программ. По сводным данным популяционных раковых регистров стран Европы, 1-летняя выживаемость больных РЯ составляет 63%, 3-летняя — 41%, 5-летняя — 35% [113]. Серозные карциномы яичников составляют до 80% от числа всех злокачественных опухолей придатков матки [30; 31], и, несмотря на усилия мирового научного сообщества, значительных успехов в снижении показателя смертности этой категории больных добиться все еще не удалось. Причиной тому, очевидно, является поздняя диагностика заболевания, связанная с отсутствием специфических симптомов болезни и эффективных скрининговых методов диагностики. Результаты лечения больных карциномами яичников напрямую зависят от стадии, на которой начато лечение заболевания.

Несколько крупных рандомизированных многоцентровых исследований, проведенных за последние 30 лет, не утвердили трансвагинальное УЗИ в комбинации с определением сывороточного СА-125 в качестве скрининга РЯ. Существующие методы морфологической верификации СКЯ, включающие в себя цитологическое исследование асцитической жидкости и плеврального выпота, могут быть использованы только при наличии соответствующей клинической симптоматики, а именно на III–IV стадиях болезни и не дают информации о гистологическом подтипе карцином. Для определения морфологической структуры опухоли при РЯ на сегодняшний день методом выбора остается диагностическая лапароскопия. Очевидным является необходимость разработки малоинвазивного, экономически выгодного высокочувствительного и специфичного метода диагностики СКЯ, позволяющего определить болезнь на

любой стадии, установить гистологический подтип опухоли и определить дальнейшую тактику обследования и лечения. Ряд зарубежных исследовательских работ по изучению смывов и аспирационного материала из полости матки продемонстрировали свою эффективность в отношении диагностики карцином яичников. Успешное внедрение скрининга рака шейки матки (Пап-теста) послужило основанием для развития гипотезы, согласно которой цервикальный канал и, следовательно, полость матки могут содержать злокачественные клетки и при РЯ. Целью данного исследования явилось повышение эффективности диагностики РЯ на основании иммуноцитохимического анализа аспирационного материала из полости матки.

В настоящем исследовании общее число испытуемых составило 221 женщина. Средний возраст пациенток составил  $54,2 \pm 9,68$  года, лет. Все группы исследования были сопоставимы по возрасту ( $p > 0,05$ ). В IA подгруппе серозных high-grade карцином яичников ( $n=51$ ) большинство пациенток ( $n=42$ , 82,3%) имели IIIc стадию заболевания. У 9 (17,7%) больных в процессе обследования установлена IV стадия серозного high-grade РЯ (цитологически верифицированный метастатический плеврит). В IB подгруппу включены 20 пациенток с low-grade серозным раком яичников, 16 (80%) из которых имели IIIc стадию, 4 (20%) —IV стадию заболевания по FIGO. Во II группу исследования были включены больные с метастатическим поражением яичников ( $n=50$ ). В данную группу включены пациентки с карциномами молочной железы ( $n=15$ , 30%), желудка ( $n=6$ , 12%), толстой кишки ( $n=9$ , 18%), поджелудочной железы ( $n=8$ , 16%) и почки ( $n=2$ , 4%). Были исключены больные, получавшие гормонотерапию ингибиторами ароматазы, антиэстрогенами или аналогами ГРГ. III группу составили 50 пациенток с доброкачественными опухолями яичников. В эту группу были включены больные с морфологически подтвержденной серозной папиллярной цистаденомой ( $n=15$ , 30%), муцинозной цистаденомой ( $n=13$ , 26%), зрелой тератомой ( $n=8$ , 16%), текомой ( $n=8$ , 16%), эндометриоидными кистами ( $n=6$ , 12%). IV группой стала группа контроля из 50 здоровых женщин-добровольцев.

Результаты цитологического и иммуноцитохимического исследования аспирационного материала из полости матки, проведенного в рамках настоящей работы коррелируют с данными мировой литературы.

При оценке эффективности цитологического метода исследования аспирационного материала из полости матки с применением системы Cytospin-3 в диагностике серозных карцином яичников, полученного с использованием двухходового силиконового катетера и физиологического раствора по усовершенствованной нами методике установлено, что его чувствительность составляет 63,3%. При рутинном цитологическом исследовании аспирационного материала из полости матки больных серозным high-grade раком яичников единичные клетки соответствующей карциномы или их комплексы были выявлены у 33 пациенток, что составило 64,7%; в подгруппе с low-grade карциномами—у 12 пациенток из 20, что составило 60%.

Результаты исследования цитологического метода диагностики с целью детекции клеток карциномы во внутриматочных смывах зарубежными авторами несколько отличаются от полученных нами результатов: чувствительность метода варьирует по разным источникам от 12 до 40% [39; 42], что, вероятнее всего, обусловлено недостаточной информативностью однослойных цитопрепаратов. Используемая нами система Cytospin-3 продемонстрировала свою эффективность в работах М.В. Савостиковой по исследованию экссудата брюшной и плевральной полостей при РЯ, существенно увеличивая диагностическую информативность образцов [6–8; 11].

При иммуноцитохимическом исследовании аспирационного материала из полости матки больных high-grade СКЯ III–IV стадий (n=51) экспрессия маркера p53 выявлена в 31 образце, что составило 61% наблюдений. Таким образом, у 31 из 33 пациенток этой подгруппы в клетках карциномы присутствовали мутации гена TP53, определяемые с помощью МКАТ, которые мы использовали в своей работе (клон D-07). Отрицательная ИЦХ реакция в 2 других наблюдениях в первую очередь свидетельствует о необходимости применения дополнительных МКАТ, и

не исключает наличия мутаций гена *TP53*, которые данный стандартный набор антител не способен выявить.

Полученные нами результаты анализа экспрессии p53 в аспирационном материале из полости матки коррелируют с данными исследования, опубликованного под эгидой Американского Сообщества Клинической Онкологии в 2015 году: в 60% образцов смывов из полости матки пациенток high-grade СКЯ (18 из 30 наблюдений) E. Maritchnegg et al. (2015) методом генного секвенирования смогли определить мутации *TP53*. Отметим, что в это зарубежное исследование были включены больные high-grade СКЯ с IIc по IIIc стадию по FIGO, больные РЯ иных гистологических форм, доброкачественными опухолями, а также пациенты с вторичным поражением яичников, а панель исследуемых маркеров включала в себя значительно более широкий спектр – до 24 маркеров (*AKT1, NRAS, KRAS, BRAF, PIK3CA, PTEN, PPP2R1A, FGFR2* и др.), чем использованы в нашей работе. Однако, несмотря на различия применяемых методов исследования аспирационного материала, прослеживается идентичность результатов анализа мутации *TP53* как и в работе E. Maritchnegg et.al. [63].

Как отмечено ранее, наибольшей чувствительностью в группе больных СКЯ (n=71), продемонстрировала комбинация всех исследуемых маркеров, составляя 63,38 %, а также маркер WT1, составляя 52,11%. По данным M. Kobel et al. (2009), оценивших экспрессию данного маркера в ткани опухоли больных СКЯ обоих гистологических подтипов иммуногистохимическим методом, экспрессия WT1 прослеживается практически в 90% наблюдений [50]. Учитывая, что в нашей работе мы исследовали не опухолевую ткань, а клеточный состав содержимого из полости матки больных диссеминированными формами СКЯ, полученный нами результат экспрессии WT1 обусловлен отсутствием атипических клеток в определенной доле наблюдений: отрицательный результат цитологического исследования был получен у 26 больных из 71, что составляет 36,6%. В выявленных нами клетках рака 33 образцов больных high-grade СКЯ положительная реакция WT1 прослеживалась у 24 из них, что составляет 73% от общего количества положительных цитологических образцов. Таким образом,

значительный вклад в чувствительность исследуемых маркеров, особенно WT1, вносит наличие клеток рака в изучаемом образце. В этой связи при проведении ИЦХ исследовании аспирационного материала из полости матки целесообразно на первом этапе оценивать экспрессию маркера WT1 в выявленных клетках карциномы, а при положительном результате дальнейший анализ экспрессии комбинации маркеров p53 и p16 позволяет увеличить предсказательную ценность положительного результата до 89,3%, а отрицательного — до 99%.

Продолжая анализировать полученные нами результаты ИЦХ исследования аспирационного материала из полости матки, остановимся подробнее на группе low-grade СКЯ. Согласно многочисленным мировым исследованиям, данная группа опухолей в виду особенности канцерогенеза, характеризуется отсутствием в преобладающем числе наблюдений мутаций *TP53* и значительно более редкими чем при high-grade СКЯ мутациями *CDK2A*, демонстрируя особую реакцию при ИГХ-исследовании образцов опухоли соответствующих маркеров (негативный p53 и диффузный паттерн p16). Исследуя образцы ткани опухоли 10 больных low-grade СКЯ, в своей работе A.D. Altman et al. (2013) установили, что именно эта комбинация прослеживается во всех исследуемых образцах [17], а согласно проведенному анализу, все образцы ткани всех 10 пациенток с low-grade карциномами вошедших в исследование, характеризовались отсутствием экспрессии p53 и диффузной окраской ядер при анализе экспрессии p16. Согласно полученным нами данным из 20 больных low-grade карциномами у 12 пациенток (60%) при цитологическом исследовании аспирационного материала из полости матки были выявлены единичные клетки карциномы или их комплексы, что подтвердилось и при ИЦХ исследовании полученного материала. Выраженная ядерная экспрессия WT1 прослеживалась в этих же 12 образцах, в то время как реакция с МКАТ к белку p53 в клетках карциномы была отрицательной. В образцах 2х пациенток были обнаружены пласты клеток эндометрия со слабой и умеренной экспрессией p53 в ядрах. При морфологическом исследовании эндометрия в последнем патологии не выявлено. Таким образом, возможно выдвинуть предположение, что положительная экспрессия p53 ядрами клеток эндометрия в

этих наблюдениях может свидетельствовать о проявлении самых ранних молекулярных механизмах малигнизации эндометрия. Ядерная экспрессия p16 прослеживается в клетках карциномы в образцах 3-х больных. В аспирационном материале 8 (40%) больных low-grade карциномами клеток рака выявлено не было.

При расчете показателей диагностической информативности исследуемых маркеров в подгруппе больных СКЯ high-grade подтипа (n=51) при сравнении с группой low-grade (n=20), установлено, что диагностическая чувствительность всей комбинации маркеров в качестве метода дифференциальной диагностики составляет 64,7% при специфичности равной 85%. Анализ показателей этой подгруппы пациентов в сравнении с таковыми в подгруппе больных low-grade карциномами (n=20), продемонстрировал статистически значимые различия между ними ( $p < 0,0001$ ). Проведение ROC-анализа показало, что ИЦХ-метод исследования аспирационного материала из полости матки на маркеры p53, p16, WT1 применим в качестве дополнительного для проведения дифференциальной диагностики СКЯ high-grade и low-grade подтипов: значение AUC составляет 0,833 при значении  $p < 0,0001$ .

В 48 (96%) наблюдениях метастазов в яичниках (карцином кишки, почки, молочной железы, желудка и поджелудочной железы) при цитологическом исследовании аспиратов у больных клеток рака выявлено не было. Только в одном наблюдении у пациентки с метастазом колоректального рака в яичник в аспирате из полости матки выявили клетки адеокарциномы эндометриоидного типа, что также подтвердилось при ИЦХ исследовании выраженной положительной экспрессией белка p53. У одной из пациенток с метастазом РМЖ в яичнике в аспирате из полости матки определялись псевдопапиллярные скопления эпителиальных клеток без выраженных признаков злокачественности, подозрительные в отношении пограничной опухоли яичников. При ИЦХ исследовании отмечалась умеренная положительная реакция белка p53 в 10% опухолевых клетках и высокий индекс пролиферативной активности Ki67=65%. При классическом цитологическом исследовании аспиратов из полости матки 50 пациенток с доброкачественной патологией яичников атипических клеток

в материале не найдено. Только в двух наблюдениях серозной цистаденомы яичников при ИЦХ анализе выявлена умеренная экспрессия p53 в части клеток эндометрия, причем в одном из них отмечалась умеренная экспрессия p16 и высокий индекс Ki67=50%, при отсутствии экспрессии WT1. Выраженная экспрессия p16 в отдельных скоплениях эндометрия сосочкового строения при отсутствии экспрессии других маркеров выявлена также у пациентки с муцинозной цистаденомой яичников (p53-/WT1-). Индекс пролиферативной активности в клетках эпителия эндометрия при доброкачественных опухолях яичников варьировал в пределах от 1 до 15%.

В контрольную группу вошли 50 практически здоровых женщин-добровольцев, проходивших профилактический осмотр. При цитологическом исследовании клеточного состава аспиратов из полости матки у всех женщин, не имеющих в анамнезе патологии со стороны гинекологической сферы, клеток рака не было выявлено. Проведено иммуноцитохимическое исследование с антителами к антигенам WT1, p53, p16. Экспрессия WT1 была отрицательной во всех 50 наблюдениях, положительная ИЦХ реакция с p16 отмечалась в 3 исследованиях, но имела слабо выраженную экспрессию в единичных клетках подтвержденного в дальнейшем гистологически пролиферирующего эндометрия. Экспрессия p53 была отрицательной у 49 женщин, и только в одном наблюдении отмечена слабая очаговая экспрессия белка p53 в клетках эндометрия. В дальнейшем при динамическом наблюдении в течении нескольких лет, методом аспирационной биопсии гистологически в этом наблюдении была диагностирована атипичная гиперплазия. У остальных 49 обследуемых отмечены варианты физиологического состояния эндометрия.

Таким образом, в результате настоящего исследования, при расчете показателей диагностической информативности изучаемых маркеров и их комбинации в диагностике СКЯ, установлено, что при ИЦХ исследовании аспирационного материала из полости матки у больных исследуемых групп различия в экспрессии маркеров p53, p16, WT1 являются статистически значимыми; при относительно невысокой чувствительности анализа их



комбинации (63,68%) и выраженной специфичности (98%). Этот перспективный, на наш взгляд подход, может быть использован в качестве дополнительного метода диагностики, но не для первичного скрининга РЯ, что соответствует данным крупных мировых исследований.

Кроме того, согласно проведенному анализу, ИЦХ исследование экспрессии комбинации маркеров p53, p16, WT1 в аспирационном материале из полости матки может служить дополнительным методом для проведения дифференциальной диагностики опухолей яичников: при проведении ROC-анализа экспрессии маркеров и их комбинации в группе больных СКЯ, доброкачественными опухолями яичников и метастатическим поражением яичников, установлено, что в обоих случаях максимальное значение AUC достигается при оценке комбинации и составляет 0,817 для группы доброкачественных опухолей и 0,831 для группы метастазов.

Таким образом, суммируя вышеизложенное следует отметить, что исследование клеточного содержимого из полости матки является перспективным направлением в диагностике серозного РЯ, требующим дальнейшего накопления клинического материала, включения в исследование больных ранними стадиями, изучения панели новых маркеров и их комбинаций с целью детекции наиболее чувствительных и специфичных из них.

## ВЫВОДЫ

1. Аспирационный материал из полости матки, полученный с помощью двупросветного силиконового катетера и физиологического раствора является диагностически информативным и позволяет подтвердить диагноз серозного рака цитологическим методом у пациенток с III-IV стадиями болезни в 64,7% наблюдений (45 из 71).

2. При ИЦХ исследовании аспирационного материала из полости матки экспрессия p53, p16, WT1 определялась в группе больных серозным high-grade раком яичников в 61%, 49%, 47% наблюдений соответственно, в группе больных low-grade раком яичников – 10%, 15%, 60% соответственно, в группе больных метастатическими и доброкачественными опухолями яичников, а также контрольной группе экспрессия исследуемых маркеров не выявлена.

3. При ИЦХ исследовании аспирационного материала из полости матки установлены статистически значимые различия частоты экспрессии маркеров и их комбинации среди больных серозным раком яичников, доброкачественными и метастатическими опухолями яичников, а также практически здоровых женщин; показатели диагностической информативности комбинации маркеров p53, p16, WT1 превышают таковые, чем каждого маркера в частности.

4. При ИЦХ исследовании аспирационного материала из полости матки целесообразно на первом этапе оценивать экспрессию маркера WT1, при положительной реакции которого, дальнейший анализ наличия совместной экспрессии маркеров p53 и p16 позволяет увеличить предсказательную ценность положительного результата до 89,3%, а отрицательного – до 99%.

5. Иммуноцитохимическое исследование экспрессии маркеров p53, p16, WT1 в аспирационном материале из полости матки может быть использовано в качестве вспомогательного метода для проведения дифференциальной диагностики между high- и low-grade серозными карциномами яичников, а также между первичным серозным раком яичников и доброкачественными или метастатическими опухолями яичников.

**СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ**

HGOSC — high-grade ovarian serous cancer (рак яичников высокой степени злокачественности)

EGFR — epidermal growth factor receptor, эпидермальный фактор роста

FIGO — международная федерация акушеров гинекологов

HER2 — рецептор к эпидермальному фактору роста 2 (human epidermal growth factor receptor 2)

LGOSC — low-grade ovarian serous cancer (рак яичников низкой степени злокачественности)

LCM — Laser capture microdissection (лазерная микродиссекция)

MSI — microsatellite instability (микросателлитная нестабильность)

ЗНО — злокачественные новообразования

ИГХ — иммуногистохимический

ИЦХ — иммуноцитохимический

ИП — истинно положительный

ИЭК — интраэпителиальная эндометриальная карцинома

ЛГ — лютеинизирующий гормон

МКАТ — моноклональные антитела

РЭ — рак эндометрия

РЯ — рак яичников

СКЯ — серозная карцинома яичников

СТИК — серозная трубная интраэпителиальная карцинома

СТИП — серозное трубное интраэпителиальное поражение

ФСГ — фолликулостимулирующий гормон

**СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Алексеева, М.Л. Опухолевые маркеры в гинекологии / М.Л. Алексеева, М.Д. Фанченко, Е.А. Новиков Е.А., Маргиани Ф.Р. // Акушерство и гинекология. – 1995. – Т. 71. – № 5.
2. Асатурова, А.В. Источники происхождения серозных карцином яичника высокой степени злокачественности / А.В. Асатурова // Злокачественные опухоли. – 2019. – Т. 9. – № 3s1. – С. 9-14.
3. Бохман, Я.В. Руководство по онкогинекологии: Монография / Я.В. Бохман. – Ленинград: Медицина, 1989. – 272 с.
4. Внутритрубное развитие человека: Руководство для врачей / ред. А.П. Милованов, С.В. Савельев. – Москва: Веди, 2006. – 384 с.
5. Гланц, С.А. Медико-биологическая статистика / С.А. Гланц. – Москва: Практика, 1999. – 459 с.
6. Гокадзе, Н.Н. Иммуноцитохимический анализ аспирационного материала из полости матки в диагностике серозных карцином яичников / Н.Н. Гокадзе, В.Ю. Сельчук, Г.И. Краснощекова и др. // Вопросы Онкологии. – 2020. – Т. 66. – № 2. – С. 160-166.
7. Жордания, К.И. Диагностическая значимость маркеров p53, p16, WT1 в аспирационном материале из полости матки у больных серозным раком яичников / К.И. Жордания, Н.Н. Гокадзе, М.В. Савостикова и др. // Онкогинекология. – 2019. – Т. 1. – № 29. – С. 28-35.
8. Жордания, К.И. Клеточная экспрессия маркеров P53, P16, WT1 в аспирационном материале из полости матки у больных tuboовариальным серозным раком / К.И. Жордания, Н.Н. Гокадзе, М.В. Савостикова и др. // Онкогинекология. – 2019. – Т. 2. – № 30. – С. 35-42.
9. Жордания, К.И. Рак эндометрия или рак яичников? / К.И. Жордания, Ю.Г. Паяниди, М.В. Савостикова и др. // Акушерство И Гинекология: Новости, Мнения, Обучение. – 2017. – Т. 1. – № 15. – С. 63-68.
10. Каприн, А.Д. Состояние онкологической помощи населению России в 2018 году / А.Д. Каприн, В.В. Старинский, Г.В. Петрова. – Москва: МНИОИ им.

П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2019. – 250 с.

11. Савостикова, М.В. Жидкостная Цитология И Иммуноцитохимическое Исследование В Цитологической Диагностике Биологических Жидкостей И Смывов С Брюшины При Онкогинекологических Заболеваниях / М.В. Савостикова // Онкогинекология. – 2013. – № 4.

12. Савостикова, М.В. Новый взгляд на цитоморфологическую диагностику рака яичников / М.В. Савостикова, К.И. Жордания, Паяниди Ю.Г., Гокадзе Н.Н. // Злокачественные Опухоли. – 2017. – Т. 7. – № 3-S1. – С. 115-116.

13. Тюляндин, С.А. Минимальные клинические рекомендации Европейского общества медицинской онкологии (ESMO) / С.А. Тюляндин. – Москва: РОНЦ, 2010. – 78 с.

14. Acs, G. WT1 is differentially expressed in serous, endometrioid, clear cell, and mucinous carcinomas of the peritoneum, fallopian tube, ovary, and endometrium / G. Acs, T. Pasha, P.J. Zhang // International Journal of Gynecological Pathology: Official Journal of the International Society of Gynecological Pathologists. – 2004. – Vol. 23. – № 2. – P. 110-118.

15. Ahmed, A.A. Driver mutations in TP53 are ubiquitous in high grade serous carcinoma of the ovary / A.A. Ahmed, D. Etemadmoghadam, J. Temple et al. // The Journal of Pathology. – 2010. – Vol. 221. – № 1. – P. 49-56.

16. Al-Hussaini, M. WT-1 assists in distinguishing ovarian from uterine serous carcinoma and in distinguishing between serous and endometrioid ovarian carcinoma / M. Al-Hussaini, A. Stockman, H. Foster et al. // Histopathology. – 2004. – Vol. 44. – № 2. – P. 109-115.

17. Altman, A.D. The diagnostic utility of TP53 and CDKN2A to distinguish ovarian high-grade serous carcinoma from low-grade serous ovarian tumors / A.D. Altman, G.S. Nelson, P. Ghatage et al. // Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc. – 2013. – Vol. 26. – № 9. – P. 1255-1263.

18. Ambros, R.A. Endometrial intraepithelial carcinoma: a distinctive lesion specifically associated with tumors displaying serous differentiation / R.A. Ambros, M.E. Sherman, C.M. Zahn et al. // *Human Pathology*. – 1995. – Vol. 26. – № 11. – P. 1260-1267.

19. Auersperg, N. Ovarian surface epithelium as a source of ovarian cancers: unwarranted speculation or evidence-based hypothesis? / N. Auersperg // *Gynecologic Oncology*. – 2013. – Vol. 130. – № 1. – P. 246-251.

20. Barakat, R.R. Absence of premalignant histologic, molecular, or cell biologic alterations in prophylactic oophorectomy specimens from BRCA1 heterozygotes / R.R. Barakat, M.G. Federici, P.E. Saigo et al. // *Cancer*. – 2000. – Vol. 89. – № 2. – P. 383-390.

21. Bast, R.C. Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma / R.C. Bast, M. Feeney, H. Lazarus et al. // *The Journal of Clinical Investigation*. – 1981. – Vol. 68. – № 5. – P. 1331-1337.

22. Berchuck, A. Is There a Role for Ovarian Cancer Screening in High-Risk Women? / A. Berchuck, L.J. Havrilesky, N.D. Kauff // *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. – 2017. – Vol. 35. – № 13. – P. 1384-1386.

23. Bottoni, P. The Role of CA 125 as Tumor Marker: Biochemical and Clinical Aspects / P. Bottoni, R. Scatena // *Advances in Cancer Biomarkers*. – 2015. – P. 229-244.

24. Bray, F. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries / F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram et al. // *CA: a cancer journal for clinicians*. – 2018. – Vol. 68. – № 6. – P. 394-424.

25. Brooks, C.L. New insights into p53 activation / C.L. Brooks, W. Gu // *Cell research*. – 2010. – Vol. 20. – № 6. – P. 614-621.

26. Brosh, R. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field / R. Brosh, V. Rotter // *Nature Reviews. Cancer*. – 2009. – Vol. 9. – № 10. – P. 701-713.

27. Burks, R.T. Micropapillary serous carcinoma of the ovary. A distinctive low-grade carcinoma related to serous borderline tumors / R.T. Burks, M.E. Sherman, R.J.

Kurman // *The American Journal of Surgical Pathology*. – 1996. – Vol. 20. – № 11. – P. 1319-1330.

28. Choi, J.-H. Gonadotropins and Ovarian Cancer / J.-H. Choi, A. Wong, Huang H.-F., Leung P. // *Endocrine reviews*. – 2007. – Vol. 28. – P. 440-61.

29. Colombo, N. Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up / N. Colombo, M. Peiretti, G. Parma et al. // *Annals of Oncology*. – 2010. – Vol. 21. – P. v23-v30.

30. Crum, C.P. Lessons from BRCA: the tubal fimbria emerges as an origin for pelvic serous cancer / C.P. Crum, R. Drapkin, D. Kindelberger et al. // *Clinical Medicine & Research*. – 2007. – Vol. 5. – № 1. – P. 35-44.

31. Crum, C.P. The distal fallopian tube: a new model for pelvic serous carcinogenesis / C.P. Crum, R. Drapkin, A. Miron et al. // *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology*. – 2007. – Vol. 19. – № 1. – P. 3-9.

32. Dabbs, D.J. Diagnostic Immunohistochemistry E-Book: Theranostic and Genomic Applications. / D.J. Dabbs. – Philadelphia: Elsevier Health Sciences, 2017.

33. Deligdisch, L. Ovarian dysplasia in prophylactic oophorectomy specimens: cytogenetic and morphometric correlations / L. Deligdisch, J. Gil, H. Kerner et al. // *Cancer*. – 1999. – Vol. 86. – № 8. – P. 1544-1550.

34. Dubeau, L. The cell of origin of ovarian epithelial tumors and the ovarian surface epithelium dogma: does the emperor have no clothes? / L. Dubeau // *Gynecologic Oncology*. – 1999. – Vol. 72. – № 3. – P. 437-442.

35. Fathalla, M.F. Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia? / M.F. Fathalla // *Lancet (London, England)*. – 1971. – Vol. 2. – № 7716. – P. 163.

36. Flesken-Nikitin, A. Ovarian surface epithelium at the junction area contains a cancer-prone stem cell niche / A. Flesken-Nikitin, C.-I. Hwang, C.-Y. Cheng et al. // *Nature*. – 2013. – Vol. 495. – № 7440. – P. 241-245.

37. George, S.H.L. Loss of LKB1 and p53 synergizes to alter fallopian tube epithelial phenotype and high-grade serous tumorigenesis / S.H.L. George, A. Milea, R. Sowamber et al. // *Oncogene*. – 2016. – Vol. 35. – № 1. – P. 59-68.

38. Giordano, A. *Molecular Pathology of Gynecologic Cancer : Current Clinical Oncology* / A. Giordano, A. Bovicelli, R.J. Kurman. – Humana Press, 2007.
39. Goldstein, N.S. WT1 is an integral component of an antibody panel to distinguish pancreaticobiliary and some ovarian epithelial neoplasms / N.S. Goldstein, D. Bassi, A. Uzieblo // *American Journal of Clinical Pathology*. – 2001. – Vol. 116. – № 2. – P. 246-252.
40. Hashi, A. Wilms tumor gene immunoreactivity in primary serous carcinomas of the fallopian tube, ovary, endometrium, and peritoneum / A. Hashi, T. Yuminamochi, S.-I. Murata et al. – 2003. – Vol. 22. – № 4. – P. 374-377.
41. Hunter, S.M. Molecular profiling of low grade serous ovarian tumours identifies novel candidate driver genes / S.M. Hunter, M.S. Anglesio, G.L. Ryland et al. // *Oncotarget*. – 2015. – Vol. 6. – № 35. – P. 37663-37677.
42. Hwang, H. Wilms tumor gene product: sensitive and contextually specific marker of serous carcinomas of ovarian surface epithelial origin / H. Hwang, L. Quenneville, H. Yaziji et al. // *Applied immunohistochemistry & molecular morphology: AIMM*. – 2004. – Vol. 12. – № 2. – P. 122-126.
43. Jacobs, I.J. Ovarian cancer screening and mortality in the UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening (UKCTOCS): a randomised controlled trial / I.J. Jacobs, U. Menon, A. Ryan et al. // *Lancet (London, England)*. – 2016. – Vol. 387. – № 10022. – P. 945-956.
44. James, A. Nucleolar stress with and without p53 / A. James, Y. Wang, H. Raje et al. // *Nucleus*. – 2014. – Vol. 5. – № 5. – P. 402-426.
45. Jones, S. Low-grade serous carcinomas of the ovary contain very few point mutations / S. Jones, T.-L. Wang, R.J. Kurman et al. // *The Journal of Pathology*. – 2012. – Vol. 226. – № 3. – P. 413-420.
46. Kandoth, C. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma / C. Kandoth, N. Schultz, A.D. Cherniack et al. // *Nature*. – 2013. – Vol. 497. – № 7447. – P. 67-73.
47. Karst, A.M. Stathmin 1, a marker of PI3K pathway activation and regulator of microtubule dynamics, is expressed in early pelvic serous carcinomas / A.M. Karst, K.



Levanon, S. Duraisamy et al. // *Gynecologic Oncology*. – 2011. – Vol. 123. – № 1. – P. 5-12.

48. Kinde, I. Evaluation of DNA from the Papanicolaou test to detect ovarian and endometrial cancers / I. Kinde, C. Bettgowda, Y. Wang et al. // *Science Translational Medicine*. – 2013. – Vol. 5. – № 167. – P. 167ra4.

49. Kindelberger, D.W. Intraepithelial carcinoma of the fimbria and pelvic serous carcinoma: Evidence for a causal relationship / D.W. Kindelberger, Y. Lee, A. Miron et al. // *The American Journal of Surgical Pathology*. – 2007. – Vol. 31. – № 2. – P. 161-169.

50. Köbel, M. A limited panel of immunomarkers can reliably distinguish between clear cell and high-grade serous carcinoma of the ovary / M. Köbel, S.E. Kalloger, J. Carrick et al. // *The American Journal of Surgical Pathology*. – 2009. – Vol. 33. – № 1. – P. 14-21.

51. Kroeger, P.T. Pathogenesis and heterogeneity of ovarian cancer / P.T. Kroeger, R. Drapkin // *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology*. – 2017. – Vol. 29. – № 1. – P. 26-34.

52. Kurman, R.J. The Dualistic Model of Ovarian Carcinogenesis: Revisited, Revised, and Expanded / R.J. Kurman, I.-M. Shih // *The American Journal of Pathology*. – 2010. – Vol. 34. – № 3. – P. 733-747.

53. Labidi-Galy, S.I. 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. – № 1. – P. 1093.

54. Landen, C.N. Early events in the pathogenesis of epithelial ovarian cancer / C.N. Landen, M.J. Birrer, A.K. Sood // *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. – 2008. – Vol. 26. – № 6. – P. 995-1005.

55. Lauchlan, S.C. Tubal (serous) carcinoma of the endometrium / S.C. Lauchlan // *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. – 1981. – Vol. 105. – № 11. – P. 615-618.

56. Lee, Y. A candidate precursor to serous carcinoma that originates in the distal fallopian tube / Y. Lee, A. Miron, R. Drapkin et al. // *The Journal of Pathology*. – 2007. – Vol. 211. – № 1. – P. 26-35.

57. Leroy, B. The TP53 website: an integrative resource centre for the TP53 mutation database and TP53 mutant analysis / B. Leroy, J.L. Fournier, C. Ishioka // *Nucleic Acids Research*. – 2013. – Vol. 41. – P. D962-969.

58. Levanon, K. FOXO3a loss is a frequent early event in high-grade pelvic serous carcinogenesis / K. Levanon, S. Sapoznik, K. et al. // *Oncogene*. – 2014. – Vol. 33. – № 35. – P. 4424-4432.

59. Longatto, Filho A. Identification of the primary site of metastatic adenocarcinoma in serous effusions. Value of an immunocytochemical panel added to the clinical arsenal / A. Longatto Filho, V.A.F. Alves, C.T. Kanamura et al. // *Acta Cytologica*. – 2002. – Vol. 46. – № 4. – P. 651-658.

60. Lukas, J. Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16 / J. Lukas, D. Parry, L. Aagaard et al. // *Nature*. – 1995. – Vol. 375. – № 6531. – P. 503-506.

61. Malpica, A. Interobserver and intraobserver variability of a two-tier system for grading ovarian serous carcinoma / A. Malpica, M.T. Deavers, C. Tornos et al. // *The American Journal of Surgical Pathology*. – 2007. – Vol. 31. – № 8. – P. 1168-1174.

62. Manu, V. Serous ovarian tumors: Immunohistochemical profiling as an aid to grading and understanding tumorigenesis / V. Manu, T.A. Hein, D. Boruah et al. // *Medical Journal, Armed Forces India*. – 2020. – Vol. 76. – № 1. – P. 30-36.

63. Maritschnegg, E. Lavage of the Uterine Cavity for Molecular Detection of Müllerian Duct Carcinomas: A Proof-of-Concept Study / E. Maritschnegg, Y. Wang, N. Pecha et al. // *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. – 2015. – Vol. 33. – № 36. – P. 4293-4300.

64. Massuger, L. The origin of serous ovarian cancer may be found in the uterus: a novel hypothesis / L. Massuger, T. Roelofsen, M. van Ham et al. // *Medical Hypotheses*. – 2010. – Vol. 74. – № 5. – P. 859-861.

65. Medeiros, F. The Tubal Fimbria Is a Preferred Site for Early Adenocarcinoma in Women With Familial Ovarian Cancer Syndrome: / F. Medeiros, M.G. Muto, Y. Lee et al. // *The American Journal of Surgical Pathology*. – 2006. – Vol. 30. – № 2. – P. 230-236.

66. Meek, D.W. Posttranslational Modification of p53: Cooperative Integrators of Function / D.W. Meek, C.W. Anderson // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. – 2009. – Vol. 1. – № 6.

67. Menon, U. Sensitivity and specificity of multimodal and ultrasound screening for ovarian cancer, and stage distribution of detected cancers: results of the prevalence screen of the UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening (UKCTOCS) / U. Menon, A. Gentry-Maharaj, R. Hallett et al. // *The Lancet. Oncology*. – 2009. – Vol. 10. – № 4. – P. 327-340.

68. Merlo, A. 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers / A. Merlo, J.G. Herman, L. Mao et al. // *Nature Medicine*. – 1995. – Vol. 1. – № 7. – P. 686-692.

69. Milea, A. Retinoblastoma pathway deregulatory mechanisms determine clinical outcome in high-grade serous ovarian carcinoma / A. Milea, S.H.L. George, D. Matevski et al. // *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* – 2014. – Vol. 27. – № 7. – P. 991-1001.

70. Mingels, M.J.J.M. High prevalence of atypical hyperplasia in the endometrium of patients with epithelial ovarian cancer / M.J.J.M. Mingels, R. Masadah, Y.P. Geels et al. // *American Journal of Clinical Pathology*. – 2014. – Vol. 142. – № 2. – P. 213-221.

71. Miyashita, T. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene / T. Miyashita, J.C. Reed // *Cell*. – 1995. – Vol. 80. – № 2. – P. 293-299.

72. Moore, K. Keith L. Moore, T.V.N.Persaud, Mark G. Torchia: *The Developing Human. Clinically Oriented Embryology*. 11th edition. Elsevier, 2020. / K. Moore, V. Persaud, M. Torchia. – 2020.

73. Morgan, R.J. Ovarian Cancer, Version 1.2016, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology / R.J. Morgan, D.K. Armstrong, R.D. Alvarez et al. // *Journal of*

the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN. – 2016. – Vol. 14. – № 9. – P. 1134-1163.

74. MUC16 (CA125): tumor biomarker to cancer therapy, a work in progress / M. Felder [et al.] // *Molecular Cancer*. – 2014. – Vol. 13. – P. 129.

75. Nakano, K. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53 / K. Nakano, K.H. Vousden // *Molecular Cell*. – 2001. – Vol. 7. – № 3. – P. 683-694.

76. Ness, R.B. Possible role of ovarian epithelial inflammation in ovarian cancer / R.B. Ness, C. Cottreau // *Journal of the National Cancer Institute*. – 1999. – Vol. 91. – № 17. – P. 1459-1467.

77. Nik, N.N. Origin and pathogenesis of pelvic (ovarian, tubal, and primary peritoneal) serous carcinoma / N.N. Nik, R. Vang, I.-M. Shih et al. // *Annual Review of Pathology*. – 2014. – Vol. 9. – P. 27-45.

78. Nofech-Mozes, S. Immunophenotyping of serous carcinoma of the female genital tract / S. Nofech-Mozes, M. Khalifa, N. Ismiil et al. // *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* – 2008. – Vol. 21. – P. 1147-55.

79. Okamura, H. Detailed morphology of human ovarian surface epithelium focusing on its metaplastic and neoplastic capability / H. Okamura, H. Katabuchi // *Italian Journal of Anatomy and Embryology = Archivio Italiano Di Anatomia Ed Embriologia*. – 2001. – Vol. 106. – № 2 Suppl 2. – P. 263-276.

80. O'Neill, C.J. High-grade ovarian serous carcinoma exhibits significantly higher p16 expression than low-grade serous carcinoma and serous borderline tumour / C.J. O'Neill, H.A. McBride, L.E. Connolly et al. // *Histopathology*. – 2007. – Vol. 50. – № 6. – P. 773-779.

81. Otsuka, I. Early detection of ovarian and fallopian tube cancer by examination of cytological samples from the endometrial cavity / I. Otsuka, S. Kameda, K. Hoshi // *British Journal of Cancer*. – 2013. – Vol. 109. – № 3. – P. 603-609.

82. Ozcan, A. PAX2 and PAX8 Expression in the Ovarian Surface Epithelium and Inclusion Cysts / A. Ozcan, L.D. Truong // *The American Journal of Surgical Pathology*. – 2012. – Vol. 36. – № 7. – P. 1100–1102.

83. Pavlik, E.J. Ovarian cancer screening effectiveness: A realization from the UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening / E.J. Pavlik // *Women's Health (London, England)*. – 2016. – Vol. 12. – № 5. – P. 475-479.

84. Piek, J.M. Dysplastic changes in prophylactically removed Fallopian tubes of women predisposed to developing ovarian cancer / J.M. Piek, P.J. Van Diest, R.P. Zweemer et al. // *The Journal of Pathology*. – 2001. – Vol. 195. – № 4. – P. 451-456.

85. Pinsky, P.F. Extended mortality results for ovarian cancer screening in the PLCO trial with median 15years follow-up / P.F. Pinsky, K. Yu, B.S. Kramer et al. // *Gynecologic Oncology*. – 2016. – Vol. 143. – № 2. – P. 270-275.

86. Prat, J. Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum / J. Prat, FIGO Committee on Gynecologic Oncology // *International Journal of Gynaecology and Obstetrics: The Official Organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*. – 2014. – Vol. 124. – № 1. – P. 1-5.

87. Prat, J. New insights into ovarian cancer pathology / J. Prat // *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*. – 2012. – Vol. 23 Suppl 10. – P. x111-117.

88. Rambau, P.F. Association of p16 expression with prognosis varies across ovarian carcinoma histotypes: an Ovarian Tumor Tissue Analysis consortium study / P.F. Rambau, R.A. Vierkant, M.P. Intermaggio et al. // *The Journal of Pathology. Clinical Research*. – 2018. – Vol. 4. – № 4. – P. 250-261.

89. Risch, H.A. Hormonal etiology of epithelial ovarian cancer, with a hypothesis concerning the role of androgens and progesterone / H.A. Risch // *Journal of the National Cancer Institute*. – 1998. – Vol. 90. – № 23. – P. 1774-1786.

90. Roelofsen, T. Concurrent endometrial intraepithelial carcinoma (EIC) and serous ovarian cancer: can EIC be seen as the precursor lesion? / T. Roelofsen, L.C.L.T. Van Kempen, J.A.W.M. Van der Laak et al. // *International Journal of Gynecological Cancer: Official Journal of the International Gynecological Cancer Society*. – 2012. – Vol. 22. – № 3. – P. 457-464.

91. Roh, M.H. High-grade fimbrial-ovarian carcinomas are unified by altered p53, PTEN and PAX2 expression / M.H. Roh, Y. Yassin, A. Miron et al. // *Modern Pathology*:

An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc. – 2010. – Vol. 23. – № 10. – P. 1316-1324.

92. Rojas, V. Molecular Characterization of Epithelial Ovarian Cancer: Implications for Diagnosis and Treatment / V. Rojas, K.M. Hirshfield, S. Ganesan et al. // International Journal of Molecular Sciences. – 2016. – Vol. 17. – № 12.

93. Ryland, G.L. Mutational landscape of mucinous ovarian carcinoma and its neoplastic precursors / G.L. Ryland, S.M. Hunter, M.A. Doyle et al. // Genome Medicine. – 2015. – Vol. 7. – № 1.

94. Sadler, T.W. Langman's Medical Embryology / T.W. Ph. D. Sadler. – 12th Edition. – Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2011. – P. 384

95. Salazar, H. Microscopic benign and invasive malignant neoplasms and a cancer-prone phenotype in prophylactic oophorectomies / H. Salazar, A.K. Godwin, M.B. Daly et al. // Journal of the National Cancer Institute. – 1996. – Vol. 88. – № 24. – P. 1810-1820.

96. Samimi, G. Population Frequency of Serous Tubal Intraepithelial Carcinoma (STIC) in Clinical Practice Using SEE-Fim Protocol / G. Samimi, B. Trabert, A.M. Geczik et al. // JNCI cancer spectrum. – 2018. – Vol. 2. – № 4. – P. pky061.

97. Sampson, J.A. Metastatic or Embolic Endometriosis, due to the Menstrual Dissemination of Endometrial Tissue into the Venous Circulation / J.A. Sampson // The American Journal of Pathology. – 1927. – Vol. 3. – № 2. – P. 93-110.43.

98. Santillan, A. Differences of chemoresistance assay between invasive micropapillary/low-grade serous ovarian carcinoma and high-grade serous ovarian carcinoma / A. Santillan, Y.W. Kim, M.L. Zahurak et al. // International Journal of Gynecological Cancer: Official Journal of the International Gynecological Cancer Society. – 2007. – Vol. 17. – № 3. – P. 601-606.

99. Schildkraut, J.M. Epithelial ovarian cancer risk among women with polycystic ovary syndrome / J.M. Schildkraut, P.J. Schwingl, E. Bastos et al. // Obstetrics and Gynecology. – 1996. – Vol. 88. – № 4 Pt 1. – P. 554-559.

100. Schmeler, K.M. Neoadjuvant chemotherapy for low-grade serous carcinoma of the ovary or peritoneum / K.M. Schmeler, C.C. Sun, D.C. Bodurka et al. // *Gynecologic Oncology*. – 2008. – Vol. 108. – № 3. – P. 510-514.
101. Schmeler, K.M. Low-grade serous primary peritoneal carcinoma / K.M. Schmeler, C.C. Sun, A. Malpica et al. // *Gynecologic Oncology*. – 2011. – Vol. 121. – № 3. – P. 482-486.
102. Scully, R.E. Pathology of ovarian cancer precursors / R.E. Scully // *Journal of Cellular Biochemistry. Supplement*. – 1995. – Vol. 23. – P. 208-218.
103. Seidman, J.D. Serous tubal intraepithelial carcinoma localizes to the tubal-peritoneal junction: a pivotal clue to the site of origin of extrauterine high-grade serous carcinoma (ovarian cancer) / J.D. Seidman // *International Journal of Gynecological Pathology: Official Journal of the International Society of Gynecological Pathologists*. – 2015. – Vol. 34. – № 2. – P. 112-120.
104. Serrano, M. The tumor suppressor protein p16INK4a / M. Serrano // *Experimental Cell Research*. – 1997. – Vol. 237. – № 1. – P. 7-13.
105. Sherman, M.E. Histopathologic features of ovaries at increased risk for carcinoma. A case-control analysis / M.E. Sherman, J.S. Lee, R.T. Burks et al. // *International Journal of Gynecological Pathology: Official Journal of the International Society of Gynecological Pathologists*. – 1999. – Vol. 18. – № 2. – P. 151-157.
106. Shvartsman, H.S. Comparison of the clinical behavior of newly diagnosed stages II-IV low-grade serous carcinoma of the ovary with that of serous ovarian tumors of low malignant potential that recur as low-grade serous carcinoma / H.S. Shvartsman, C.C. Sun, D.C. Bodurka et al. // *Gynecologic Oncology*. – 2007. – Vol. 105. – № 3. – P. 625-629.
107. Singer, G. Mutations in BRAF and KRAS characterize the development of low-grade ovarian serous carcinoma / G. Singer, R. Oldt, Y. Cohen et al. // *Journal of the National Cancer Institute*. – 2003. – Vol. 95. – № 6. – P. 484-486.
108. Sölétormos, G. Clinical Use of Cancer Biomarkers in Epithelial Ovarian Cancer: Updated Guidelines From the European Group on Tumor Markers / G. Sölétormos, M.J. Duffy, S. Othman Abu Hassan et al. // *International Journal of*

Gynecological Cancer: Official Journal of the International Gynecological Cancer Society. – 2016. – Vol. 26. – № 1. – P. 43-51.

109. Stanciu, P.I. Development of Peritoneal Carcinoma in women diagnosed with Serous Tubal Intraepithelial Carcinoma (STIC) following Risk-Reducing Salpingo-Oophorectomy (RRSO) / P.I. Stanciu, T.E.J. Ind, D.P.J. Barton et al. // Journal of Ovarian Research. – 2019. – Vol. 12. – № 1. – P. 50.

110. Stratton, J.F. Comparison of prophylactic oophorectomy specimens from carriers and noncarriers of a BRCA1 or BRCA2 gene mutation. United Kingdom Coordinating Committee on Cancer Research (UKCCCR) Familial Ovarian Cancer Study Group / J.F. Stratton, C.H. Buckley, D. Lowe et al. // Journal of the National Cancer Institute. – 1999. – Vol. 91. – № 7. – P. 626-628.

111. Swerdlow, M. Mesothelioma of the pelvic peritoneum resembling papillary cystadenocarcinoma of the ovary / M. Swerdlow // American Journal of Obstetrics and Gynecology. – 1959. – Vol. 77. – № 1. – P. 197-200.

112. Takashina, T. Cytologic diagnosis of primary tubal cancer / T. Takashina, E. Ito, R. Kudo // Acta Cytologica. – 1985. – Vol. 29. – № 3. – P. 367-372.

113. Torre, L.A. Ovarian cancer statistics, 2018 / L.A. Torre, B. Trabert, C.E. DeSantis et al. // CA: a cancer journal for clinicians. – 2018. – Vol. 68. – № 4. – P. 284-296.

114. Trabert, B. The Risk of Ovarian Cancer Increases with an Increase in the Lifetime Number of Ovulatory Cycles: An Analysis from the Ovarian Cancer Cohort Consortium (OC3) / B. Trabert, S. Tworoger, K. O'Brien et al. // Cancer Research. – 2020. – Vol. 80. – № 5. – P. 1210-1218.

115. Van Nagell, J.R. Long-term survival of women with epithelial ovarian cancer detected by ultrasonographic screening / J.R. Van Nagell, R.W. Miller, C.P. DeSimone et al. // Obstetrics and Gynecology. – 2011. – Vol. 118. – № 6. – P. 1212-1221.

116. Vang, R. Molecular Alterations of TP53 are a Defining Feature of Ovarian High-Grade Serous Carcinoma: A Rereview of Cases Lacking TP53 Mutations in The Cancer Genome Atlas Ovarian Study / R. Vang, D.A. Levine, R.A. Soslow et al. //



International Journal of Gynecological Pathology: Official Journal of the International Society of Gynecological Pathologists. – 2016. – Vol. 35. – № 1. – P. 48-55.

117. Vang, R. Fallopian tube precursors of ovarian low- and high-grade serous neoplasms / R. Vang, I.-M. Shih, R.J. Kurman // *Histopathology*. – 2013. – Vol. 62. – № 1. – P. 44-58.

118. Vang, R. Fallopian tube precursors of ovarian low- and high-grade serous neoplasms / R. Vang, I.-M. Shih, R.J. Kurman // *Histopathology*. – 2013. – Vol. 62. – № 1. – P. 44-58.

119. Waldstrom, M. Immunohistochemical expression of wilms tumor gene protein in different histologic subtypes of ovarian carcinomas / M. Waldstrøm, A. Grove // *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. – 2005. – Vol. 129. – № 1. – P. 85-88.

120. Werness, B.A. Histopathology of familial ovarian tumors in women from families with and without germline BRCA1 mutations / B.A. Werness, S.J. Ramus, A.S. Whittemore et al. // *Human Pathology*. – 2000. – Vol. 31. – № 11. – P. 1420-1424.

121. Whittemore, A.S. Characteristics relating to ovarian cancer risk: collaborative analysis of 12 US case-control studies. II. Invasive epithelial ovarian cancers in white women. Collaborative Ovarian Cancer Group / A.S. Whittemore, R. Harris, J. Itnyre // *American Journal of Epidemiology*. – 1992. – Vol. 136. – № 10. – P. 1184-1203.

122. Wiegand, K.C. ARID1A mutations in endometriosis-associated ovarian carcinomas / K.C. Wiegand, S.P. Shah, O.M. Al-Agha et al. // *The New England Journal of Medicine*. – 2010. – Vol. 363. – № 16. – P. 1532-1543.

123. Xian, W. The Li-Fraumeni syndrome (LFS): a model for the initiation of p53 signatures in the distal Fallopian tube / W. Xian, A. Miron, M. Roh et al. // *The Journal of Pathology*. – 2010. – Vol. 220. – № 1. – P. 17-23.

124. Zeppernick, F. Precursors of ovarian cancer in the fallopian tube: serous tubal intraepithelial carcinoma--an update / F. Zeppernick, I. Meinhold-Heerlein, I.-M. Shih // *The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. – 2015. – Vol. 41. – № 1. – P. 6-11.

125. Zhang, Y. TP53 mutations in epithelial ovarian cancer / Y. Zhang [et al.] // *Translational Cancer Research*. – 2016. – Vol. 5. – № 6. – P. 650-663.
126. Zheng, W. Fallopian tube as main source for ovarian and pelvic (non-endometrial) serous carcinomas / W. Zheng, O. Fadare // *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. – 2012. – Vol. 5. – № 3. – P. 182-186.