

*На правах рукописи*

**ПАЦАП ОЛЬГА ИГОРЕВНА**

**Клинико-морфологические особенности  
и диагностические маркеры неопластической  
трансформации  
доброкачественных эндометриоидных кистозных  
образований яичника**

14.03.02 – Патологическая анатомия

14.01.01 – Акушерство и гинекология

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание учёной степени  
кандидата медицинских наук**

Москва - 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт морфологии человека»

**Научные руководители:**

доктор медицинских наук,  
профессор

**Михалева Людмила Михайловна**

доктор медицинских наук,  
профессор

**Давыдов Александр Ильгизирович**

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук

**Баринова Ирина Владимировна**

Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии» (ГБУЗ МО «МОНИИАГ»), руководитель патологоанатомического отделения

доктор медицинских наук,  
профессор

**Дубинская Екатерина Дмитриевна**

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов», кафедра акушерства и гинекологии с курсом перинатологии медицинского института, профессор кафедры

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства»

Защита состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 года в 12.00 часов на заседании диссертационного совета (Д 001.004.01) Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт морфологии человека» по адресу: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д.3

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт морфологии человека» и на сайте <http://www.morfolhum.ru>

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 г.

**Ученый секретарь диссертационного совета**

Доктор биологических наук

**Косырева Анна Михайловна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Эндометриоз является актуальной медико-социальной проблемой. В структуре гинекологических заболеваний данная патология занимает третье место после воспалительных процессов и миомы матки. Эндометриоз диагностируют у 80% женщин, страдающих хроническими тазовыми болями и у 50% - с разными формами бесплодия (Адамян Л.В., 2017, Безруков О.Ф., 2017, Оразов М.Р., 2017, Бичурина А.С., 2017, Солопова А., 2017). Эндометриоз относится к эстроген-зависимым гинекологическим заболеваниям (Захаров И.С., 2017, Соколова-Попова Т.А., 2017).

Эндометриоз характеризуется присутствием эктопированной ткани, напоминающей эндометрий, с эндометриоидными железами и стромой. Эндометрий у женщин с диагностированным эндометриозом, по сравнению со здоровыми женщинами, может быть патологически изменен (Михалева Л.М., 2020).

Атипическая форма эндометриоза характеризуется клеточной атипией, однако часто на основании только морфологического исследования установить диагноз атипического эндометриоза представляется достаточно сложным. Важное значение в развитии эндометриоза имеют эпигенетические факторы (уровень метилирования ДНК, модификации гистоновых белков, микро-РНК) (Клейменова Т.С., 2017). В литературе описано, что сочетание мутаций генов *KRAS* и *ARID1A* впервые были идентифицированы у некоторых пациентов, что привело к выводу, что эндометриоз является предраковым заболеванием (Dawson A., 2018).

Злокачественная трансформация эндометриоза – редкое явление, которое происходит примерно в 0.7-2.5% случаев с преимущественным вовлечением в процесс яичников. Было описано, что у женщин с эндометриозом риск возникновения эндометриоидных и светлоклеточных опухолей яичника в 2-3 раза выше (Байрамова Н.Н., 2018, Качалина Т.С., 2017). Морфологические исследования выявили непрерывный процесс неопластической трансформации эпителия эндометриоидной кисты в атипичный эндометриоз и, впоследствии, в инвазивную карциному (Kuo H-H, 2017, Lagana A.S., 2017). Атипичный эндометриоз и эндометриоз-ассоциированные опухоли яичника разделяют молекулярные повреждения, такие как

мутации генов *PTEN*, *ARID1A*. Потеря экспрессии белка BAF250a предполагает наличие мутации гена *ARID1A* и является полезным ранним маркером малигнизации эндометриоза (Lin Q., 2018).

Нарушение гликозилирования является одним из процессов, развивающихся при онкологическом заболевании, и приводит к продукции опухоль-ассоциированных гликанов и гликопротеинов. Онкомаркер СА 125 является высокомолекулярным гликопротеидом, экспрессирующимся амниотическим и целомическим эпителием во время развития плода. Уровень в сыворотке 35 МЕ/мл, выявляемый у 1% здоровых доноров-женщин, расценивается как верхняя граница нормы в клинической практике. Уровень СА 125 выше 35 МЕ/мл был обнаружен у 50% пациентов со стадией I и у 90% женщин с продвинутыми стадиями карцином яичника (Hirsch M., 2017). Повышение сывороточного СА 125 может быть также связано с другими злокачественными новообразованиями (поджелудочная железа, молочная железа, толстая кишка, легкое) и доброкачественными и физиологическими состояниями, включая беременность, эндометриоз и менструацию (Давыдов А.И., 2019).

Многие исследователи считают, что уровень СА 125  $\geq 30$  МЕ/мл является показателем эндометриоза с высокой точностью только у женщин с симптомами боли и бесплодия. СА 125 должен рассматриваться как дискриминационный тест при подозрении на эндометриоз, при этом уровень СА 125  $< 30$  МЕ/мл тем не менее, не является диагностически достоверным (Скакова Р.С., 2017, Akinwunmi B.O., 2018). Такие данные свидетельствуют о том, что эндометриоз является гетерогенным заболеванием либо заболеванием с прогрессивным течением, что требует дополнительных исследований в области его биологии и механизмов развития.

Эндометриоз подразделяют на аденомиоз (эндометриоз тела матки), эндометриоз яичников (эндометриому/эндометриоидную кисту), перитонеальный эндометриоз, глубокий инфильтративный эндометриоз (Адамян Л.В., 2017, Качалина О.В., 2017). В настоящее время все большее количество исследователей склоняются к мнению, что аденомиоз и эндометриоз яичников целесообразно рассматривать как отдельные нозологические единицы из-за существенных патоморфологических, патогенетических и молекулярно-биологических особенностей (Айламазян Э.К., 2017). Результаты таких исследований и клинические наблюдения определяют

целесообразность дифференциального подхода к выяснению патогенеза разных клинико-морфологических вариантов эндометриоза, поиск новых методических подходов к изучению основных факторов (генетических, эпигенетических, медико-социальных), обуславливающих развитие данного заболевания (Абрамова С.В., 2017, Kurman R.J., 2016).

### **Степень разработанности темы исследования**

До настоящего времени ни одна из предложенных стратегий лечения эндометриоза не привела к полному излечению и не позволила избежать рецидива заболевания. Традиционное хирургическое лечение заболевания не всегда способствует полному восстановлению функций яичника и не исключает возникновения рецидивов генитального эндометриоза. Кроме того, существует определенный риск трансформации эндометриоидных гетеротопий в атипичную форму с развитием опухолей яичника, при этом биомеханизм такой трансформации остается не до конца изученным, что затрудняет разработку мер профилактики и ранней диагностики этого процесса.

В настоящее время нет универсального биомаркера, который бы мог достоверно определить наличие эндометриоза и его способность к злокачественной трансформации. Существующие сывороточные биомаркеры обладают определенной степенью достоверности, только в сочетании друг с другом. Известно, что СА 125 может повышаться при эндометриозе яичников, но данный факт расценивается как неспецифическая реакция и до настоящего времени не было исследований, посвященных этой проблеме. В данной работе было продемонстрировано, что повышение СА 125 в сыворотке крови обусловлено появлением клеток с серозной дифференцировкой в эпителии ДЭКОЯ. При рутинном гистологическом исследовании эти клетки практически не отличались от соседних эпителиоцитов, кроме приобретения способности экспрессировать серозные маркеры, которые можно выявить только при проведении иммуногистохимического исследования. Описанные в литературе изменения по типу «сапожного гвоздя», синцитиальные изменения не были связаны со способностью эпителиоцитов продуцировать серозные маркеры. Более того, в современной литературе большая часть работ посвящена связи эндометриоза и эндометриоидной и

светлоклеточной карцином яичника, в то время как взаимосвязь серозных пограничных опухолей и серозных карцином low-grade описывают единичные работы.

### **Цель исследования**

Представить клинико-морфологические, иммуногистохимические и молекулярно-генетические маркеры трансформации доброкачественных эндометриоидных кистозных образований яичника.

### **Задачи исследования**

1. На основании клинико-морфологического исследования представить диагностическую значимость сывороточного онкомаркера СА 125 в ранней детекции неопластической трансформации доброкачественных эндометриоидных кистозных образований яичника.

2. Представить сравнительную клинико-морфологическую, иммуногистохимическую и молекулярно-генетическую характеристику доброкачественных эндометриоидных кистозных образований в зависимости от уровня сывороточного онкомаркера СА 125.

3. Оценить клинико-морфологические, иммуногистохимические и молекулярно-генетические особенности эндометриоидных и серозных карцином яичников.

4. На основании проведенного исследования выделить наиболее значимые иммуногистохимические маркеры в ранней диагностике неопластической трансформации доброкачественных эндометриоидных кистозных образований яичника.

5. Разработать алгоритм клинико-морфологического, иммуногистохимического и молекулярно-генетического исследования операционного материала и лечения пациенток с доброкачественными эндометриоидными кистозными образованиями яичника в зависимости от клинических данных пациентки и уровня сывороточного онкомаркера СА 125.

### **Научная новизна**

На клиническом и морфологическом материале впервые изучены ранние признаки неопластической трансформации

доброкачественных эндометриоидных кистозных образований яичника при гистологической «доброкачественной» картине эпителиального компонента.

Впервые изучена корреляция на большом клиническом материале у пациенток с эндометриоз-ассоциированными доброкачественными и злокачественными поражениями яичников между их иммунофенотипом и особенностями изменения сывороточного онкомаркера СА 125.

Впервые разработана панель антител для иммуногистохимического исследования, оптимизирующая раннюю диагностику неопластической трансформации доброкачественных эндометриоидных кистозных образований яичника.

Предложены пути развития карцином яичника по пути серозной дифференцировки эпителия эндометриоидных кистозных образований яичника с последующим развитием серозных карцином low-grade и серозных карцином high-grade (SET-типа).

### **Теоретическая и практическая значимость**

Результаты анализа проведенного комплексного исследования способствуют более глубокому изучению проблемы эндометриоза яичников в разделе понимания патоморфологии процесса, механизмов прогрессии и неопластической трансформации.

Выявлены диагностические морфологические критерии, а также установлена диагностическая значимость иммуногистохимических маркеров в определении биологического поведения эндометриоидных гетеротопий, позволяющие планировать тактику лечения пациенток.

По результатам исследования разработан алгоритм клинικο-морфологического, иммуногистохимического и молекулярно-генетического исследования операционного материала и лечения пациенток с доброкачественными эндометриоидными кистозными образованиями яичника в зависимости от клинических данных пациентки и уровня сывороточного онкомаркера СА 125

Разработана иммуногистохимическая панель диагностических маркеров, что позволяет оптимизировать лечебную тактику с учетом потенциального развития карцином.

## Методология и методы исследования

Методология диссертационной работы основана на изучении клинико-морфологической, иммуногистохимической и молекулярно-генетической характеристик доброкачественных эндометриоидных кистозных образований у пациенток в зависимости от уровня сывороточного онкомаркера СА 125, а также сравнении с аналогичными показателями у пациенток с карциномами яичника.

Алгоритм обследования включал в себя изучение клинико-анамнестических, морфологических, цитологических, иммуногистохимических, молекулярно-генетических методов исследования.

## Положения, выносимые на защиту

1. Появление серозной дифференцировки эпителия в доброкачественных эндометриоидных кистозных образованиях яичника напрямую коррелирует с повышенным уровнем сывороточного СА 125 свыше 60 МЕ/мл ( $p < 0,0001$ ).

2. На основании иммуногистохимических и молекулярно-генетических особенностей выделены два типа изменений в эпителии эндометриоидных кистозных образований яичника: изменения по типу серозной дифференцировки low-grade и high-grade, что может свидетельствовать о морфогенетической связи с карциномами яичника.

Серозная дифференцировка эпителия доброкачественных эндометриоидных кистозных образований яичника по типу low-grade характеризуется наличием положительной ядерной экспрессии WT1, p53, wild-type, *ARID1A*(BAF250a) и отсутствием мутации гена *KRAS*.

Серозная дифференцировка эпителия по типу high-grade характеризуется положительной ядерной экспрессией WT1, p53, mutant-type, *ARID1A*(BAF250a) и мутацией гена *KRAS*.

3. Пациенткам с доброкачественными эндометриоидными кистозными образованиями яичника необходимо проводить диагностику сывороточного онкомаркера СА 125, а в случае его повышения свыше 60 МЕ/мл, показано проведение хирургического лечения в объеме цистэктомии с последующим комплексным патолого-анатомическим исследованием операционного материала в сочетании с иммуногистохимическим маркированием с



использованием панели антител: WT1, p53, *ARID1A*(BAF250a) и молекулярно-генетическим исследованием мутации гена *KRAS*.

### **Степень достоверности и апробация работы**

Достоверность результатов обеспечивается последовательным и логичным изложением задач исследования и их решением, использованием комплекса современных методов, достаточным объемом данных для каждой исследуемой группы и количеством групп сравнения, адекватным применением методов статистического анализа, критической оценкой полученных результатов при сравнении их с данными современной литературы.

Материалы и основные положения диссертации были доложены и обсуждались на "I Крымском форуме «Онкология, патоморфология и патофизиология: от теории к практике»" (сентябрь 2020 г.), на Третьем Международном Форуме онкологии и радиологии (сентябрь 2020 г.), на Всероссийской конференции с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» (ноябрь 2020 г.). Апробация диссертации состоялась на межлабораторной конференции ФГБНУ НИИ морфологии человека совместно с сотрудниками кафедры акушерства и гинекологии Института клинической медицины ПМГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) 26 января 2021 г., протокол № 1.

### **Личный вклад автора**

Личное участие автора заключалось в сборе литературных данных, их анализе и обобщении, сборе материала, диагностике, анализе, получении данных, проведении морфометрии полученных иммуногистохимических реакций, статистической обработке, обобщении и анализе полученных результатов, подготовке публикаций.

### **Публикации по теме работы**

Результаты исследования изложены в 7 научных работах, 5 из которых опубликованы в журналах RSCI WoS (1), Scopus (4), входящих в перечень рецензируемых научных изданий ВАК, где должны быть размещены основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук. Получен 1 патент на изобретение.

## **Внедрение результатов в практику**

Результаты исследования внедрены в работу патологоанатомического и гинекологических отделений Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Городская клиническая больница им. С. С. Юдина Департамента здравоохранения города Москвы».

## **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 174 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, глав материалы и методы, результаты собственных исследования, обсуждение, практических рекомендаций, выводов и списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 67 рисунками и 19 таблицами. Список литературы включает 330 источников, из них 215 отечественных и 115 зарубежных.

### **Диссертация соответствует паспортам специальностей:**

14.03.02 Патологическая анатомия в пунктах 2, 3, 4

14.01.01 Акушерство и гинекология в пунктах 3, 4

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

Исследование было проведено на операционном материале от 117 пациенток в возрасте от 20 до 83 лет (средний возраст  $36,58 \pm 0,95$  лет) и на цитологическом материале от 11 пациенток в возрасте от 32 до 45 лет (средний возраст  $39,27 \pm 1,48$  лет) в период с 2016 по 2019 гг. в ГБУЗ ГКБ им. С. С. Юдина ДЗМ и ГБУЗ ГКБ №31 ДЗМ. В ходе исследования были сформированы следующие группы:

1. Пациентки группы I с доброкачественными эндометриоидными кистозными образованиями яичника с уровнями онкомаркера СА 125 в пределах нормы после операции цистэктомии (n=69) составили подгруппу 1-1. Пациентки группы I с доброкачественными эндометриоидными кистозными образованиями яичника до 3 см в диаметре, с нормальными уровнями СА 125, у которых производилась УЗИ-ассистированная аспирация содержимого с последующей склеротерапией и цитологическим исследованием полученного аспирата (n=11) - подгруппа 1-2.

2. Пациентки с доброкачественными эндометриоидными кистозными образованиями яичника без изменений в гистологической картине, но с повышением уровня онкомаркера СА 125 (n=35) были разделены на три группы (Таблица 1):

**Таблица 1 - Группы пациенток с повышенным уровнем СА 125**

| Группа                  | II    | III   | IV     |
|-------------------------|-------|-------|--------|
| Уровень СА 125, МЕ/мл   | 36-60 | 61-90 | 91-301 |
| Количество пациентов, n | 17    | 10    | 8      |

3. Пациентки с карциномами яичника представляли группу сравнения (V), включающую эндометриоидные, серозные high-grade (SET-типа) и low-grade (n=13).

Возраст пациенток с доброкачественными эндометриоидными кистозными образованиями яичника составил от 20 до 59 лет (в среднем  $34,63 \pm 0,68$  лет), а пациенток с опухолями яичника - от 25 до 83 лет (в среднем  $52,23 \pm 4,93$  лет). Уровнем СА 125 в пределах нормы были приняты значения до 35 МЕ/мл включительно. Исследование сывороточного уровня СА 125 проводилось на догоспитальном этапе с помощью иммунохемилюминесцентных анализаторов Architect 1000i (США) и Immulite 1000 (Япония). Ультразвуковое исследование органов малого таза осуществляли с помощью аппаратов SONIXRP медицинской компании ULTRASONIX (Япония) и MyLab 70 компании ESAOTE (Италия), снабженных высокочастотными трансвагинальными датчиками (3-9 МГц). Лапароскопию с цистэктомией проводили с помощью лапароскопической аппаратуры компании Karl Storz (Германия) и «Азимут» (Российская Федерация). Во всех наблюдениях применяли биполярную коагуляцию, санацию брюшной полости, аспирацию крови и ирригируемой жидкости на завершающем этапе операции.

### **Гистологический и иммуногистохимический методы**

Операционный материал в виде удаленных доброкачественных эндометриоидных кистозных образований яичника помещался в забуференный нейтральный 10% раствор формалина для фиксации и после стандартной гистологической проводки был залит в парафиновые блоки. Гистологические срезы толщиной 3-4 мкм были изготовлены с использованием ротационных микротомов Sacura,

окрашены гематоксилином и эозином. Иммуногистохимическое исследование с антителами к MCK, CK7, CK20, CK 8/18, Calretinin, EMA, Ki67, CEA, Vimentin, Inhibin, WT1, p53, CA 125, *ARID1A*(BAF250a) проводилось с помощью иммуностейнеров «Leica Bond-maX» (Germany). Интерпретация результатов иммуногистохимического исследования с указанными антителами осуществлялась с учетом локализации позитивных клеток (в эпителии эндометриоидных кистозных образований яичника) путем подсчета как количества окрашенных эпителиальных клеток на 100 клеток в 10 полях зрения (увеличение 400), так и интенсивности окрашивания. Полученные количественные результаты выражены в процентах, где 0 — отсутствие экспрессии, 1 — до 50% окрашенных клеток — очаговая экспрессия, 2 — более 50% окрашенных клеток — выраженная экспрессия маркера. Интенсивность цитоплазматической экспрессии маркера оценивалась в баллах, где 0 — отсутствие экспрессии, 1 — слабое (бледное) окрашивание клеток, 2 — умеренное окрашивание клеток, 3 — интенсивное (яркое) окрашивание клеток. Пролиферативную активность по экспрессии Ki-67 оценивали следующим образом: 1) 0%-20% — низкая пролиферативная активность, 2) 21%-50% — умеренная пролиферативная активность, 51%-100% — высокая пролиферативная активность. Экспрессию p53 при слабopоложительной реакции рассматривали как соответствующую wild-type гена *TP53* (слабopоложительное окрашивание), при тотально негативном или выраженном окрашивании свыше 80% ядер — mutant-type гена *TP53*.

### **Молекулярно-генетический метод ПЦР в режиме реального времени**

Оценка мутаций в гене *KRAS* осуществлялась с помощью набора реагентов Real-time-PCR-KRAS-7M предназначенных для анализа 7 мутаций в 12 и 13 кодонах гена *KRAS* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с детекцией кривых плавления РеалБест-Генетика на амплификаторе ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).

### **Цитологический метод**

Жидкое содержимое доброкачественного эндометриоидного кистозного образования, полученного после УЗИ-ассистированной

аспирации, помещали на предметные стекла и изготавливали мазки, а затем окрашивали по методу Романовского и исследовали с помощью микроскопа при увеличении  $\times 100$ ,  $\times 400$  и  $\times 1000$ .

### **Статистическая обработка данных**

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программного обеспечения StatSoft STATISTICA, v.10. Достоверность различий средних величин рассчитывали при помощи дисперсионного анализа. Связь между изучаемыми параметрами оценивали по результатам корреляционного анализа с вычислением коэффициента корреляции Пирсона ( $r$ ). Также в расчете применяли непараметрические критерии Манн – Уитни ( $U$ ) и ранговый коэффициент корреляции Спирмана ( $r_s$ ), в тех случаях, когда использование методов параметрической статистики было некорректно. Количественные критерии оценки корреляционной связи оценивались следующим образом: прямая связь: сильная (0,99-0,70), умеренная (0,69-0,30), слабая (0,29-0,01) и обратная связь: сильная (-0,99- -0,70), умеренная (-0,69- -0,30), слабая (-0,29- -0,01). Данные представляли в виде  $M \pm m$ , где  $M$  – среднее арифметическое, а  $m$  – статистическая погрешность среднего. Количественные данные представляли в виде  $Me (L-H)$ , где  $Me$  – медиана,  $L$  – 25 нижний квартиль,  $H$  – 75 верхний квартиль. Различия считались статистически достоверными (статистически значимыми) при  $p < 0,05$ .

### **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

Исследование посвящено одной из наиболее актуальных проблем — неопластической трансформации эндометриоза яичников, ее связи с опухолями яичника, в том числе с эндометриоз-ассоциированными, и изменению сывороточного онкомаркера СА 125. Согласно современным эпидемиологическим, морфологическим, молекулярно-генетическим исследованиям, эндометриоз-ассоциированные карциномы могут развиваться из эндометриоидных гетеротопий яичника. В исследовании были оценены клинические параметры, поскольку существуют опубликованные исследования, показывающие, что возраст, ИМТ и наличие лейомиомы указывают на более высокий риск злокачественной трансформации ДЭКОЯ (Zhang Y, 2019, Zhou Y, 2018). В Таблице 2 представлены сводные результаты предоперационного обследования пациенток всех групп.

**Таблица 2 - Результаты предоперационного обследования пациенток всех групп**

| Группы                                              | Возраст, лет                   | День менструального цикла        | Размеры, мм                    | Билатеральное поражение, п | ИМТ, кг/м2                       |
|-----------------------------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|----------------------------|----------------------------------|
| I (подгруппа 1-1)<br>(CA 125 = 0-35<br>МЕ/мл), n=69 | Me = 35<br>L =29,5,<br>H =40   | Me = 17<br>L =10,<br>H =22       | Me = 58<br>L =35,5,<br>H =85   | 6                          | Me = 22,9<br>L = 20,<br>H= 26,55 |
| I (подгруппа 1-2)<br>(CA 125 = 0-35<br>МЕ/мл),n=11  | Me = 41<br>L =35,<br>H =43,5   | Me =18<br>L =16,5,<br>H =20      | Me = 27<br>L =24,5,<br>H =30   | -                          | Me=24,9<br>L=22,95,<br>H=34,55   |
| II (CA 125 = 36-60<br>МЕ/мл), n=17                  | Me = 36<br>L =31,<br>H =40     | Me =16<br>L =13,<br>H =19        | Me = 35<br>L =36,<br>H =80     | 3                          | Me = 23<br>L =20,6,<br>H =26,9   |
| III (CA 125 = 61-91<br>МЕ/мл),n=10                  | Me = 33,5<br>L =29,<br>H =36,7 | Me =21,5<br>L =13,5,<br>H =27,25 | Me=63,5<br>L =55,5<br>H =80,75 | 3                          | Me=19,7<br>L=18,23,<br>H=21,38   |
| IV (CA 125 = 90-301<br>МЕ/мл), n=8                  | Me=32,5<br>L=30,25,<br>H=38,75 | Me =18<br>L =14,75,<br>H =22,5   | Me = 63<br>L =52,25<br>H =87,5 | 3                          | Me=22,3<br>L=20,48,<br>H=23,83   |
| V (карциномы),<br>n=13                              | Me = 49<br>L =42,<br>H =70     | н/д                              | Me = 95<br>L =45,<br>H =120    | 1                          | Me = 21<br>L =18,9,<br>H =23,9   |

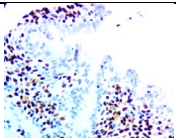
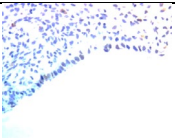
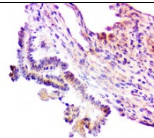
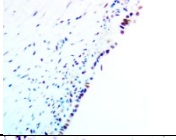
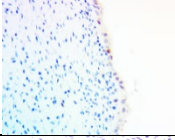
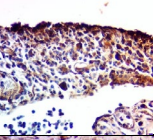
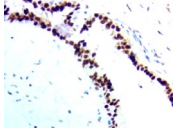
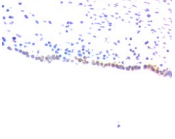
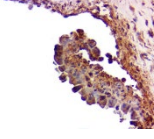
Была выявлена сильная прямая связь между уровнем сыывороточного СА 125 и экспрессией серозных иммуногистохимических маркеров WT1 и p53, а также умеренная прямая зависимость между экспрессией WT1 и экспрессией иммуногистохимического маркера СА 125. При оценке непараметрическими методами был установлен начальный уровень сыывороточного СА 125, при котором наблюдались изменения в экспрессии иммуногистохимических серозных маркеров WT1, p53 и определялась умеренная прямая или обратная корреляция с клиническими параметрами. Начиная с группы III (61-90 МЕ/мл) была выявлена умеренная прямая связь между размерами ДЭКОЯ и экспрессией иммуногистохимических маркеров WT1 и p53 и уровнем сыывороточного СА 125, а также умеренная обратная связь между ИМТ и уровнем экспрессии этих иммуногистохимических маркеров и СА 125. В группе IV (91-301 МЕ/мл) была выявлена умеренная прямая связь между размером ДЭКОЯ и уровнем сыывороточного СА 125 и экспрессией p53, а также умеренная обратная связь между ИМТ и

сывороточным СА 125 и экспрессией WT1. В группе карцином яичника обнаружена умеренная обратная связь между размером опухоли и сывороточным СА 125, а также между ИМТ, сывороточным СА 125 и экспрессией WT1. При оценке коэффициента Манна-Уитни, не было обнаружено различий в выборках. Значимой корреляции между размером ДЭКОЯ, ИМТ и экспрессией СА 125, WT1 и p53 в группах I-II (0-60 МЕ/мл) не было выявлено, т.к. коэффициент Спирмана составил -0,02-0,29, что свидетельствует о слабой прямой/обратной связи. Полученные нами результаты показали, что клинически значимым является уровень СА 125 в плазме крови более 60 МЕ/мл, при котором происходят изменения в морфологии эпителия по серозному типу, ассоциированные с увеличением размеров ДЭКОЯ и снижением ИМТ пациенток. После проведения гистологического, иммуногистохимического и молекулярно-генетического исследования нами были выявлены изменения в экспрессии WT1, p53, *ARID1A* и *KRAS* в эпителии ДЭКОЯ, подобные иммунофенотипу серозных опухолей. Результаты представлены в Таблице 3 и 4.

**Таблица 3 – Иммуногистохимический фенотип и молекулярно-генетическое исследование групп ДЭКОЯ и карцином яичника**

| Группа                                      | Ki-67  | WT1    | p53                   | СА 125 | <i>ARID1A</i><br>BAF250 | Мутация<br>гена <i>KRAS</i> |
|---------------------------------------------|--------|--------|-----------------------|--------|-------------------------|-----------------------------|
| I<br>(0-35МЕ/мл), n=69                      | 1-2%   | -      | Дикий тип<br>(wt)     | 1-2+   | 70-95%                  | Обнаружена                  |
| II<br>36-60МЕ/мл), n=17                     | 1-2%   | -      | Дикий тип<br>(wt)     | 1-2+   | 70-96%                  | -                           |
| III<br>(61-90МЕ/мл), n=10                   | 2-3%   | 20,7%  | Дикий тип<br>(wt)     | 2-3+   | 75-93%                  | -                           |
| IV<br>(91-301МЕ/мл), n=8                    | 2-4%   | 77%    | Мутантный<br>тип (mt) | 2-3+   | 83-90%                  | Обнаружена                  |
| V<br>эндометриоидная,<br>n=10               | 10-15% | -      | Дикий тип<br>(wt)     | 1-2+   | 10-43%                  | н/д                         |
| V<br>серозная low-grade,<br>n=2             | 10-15% | 35-50% | Дикий тип<br>(wt)     | 2-3+   | 60-67%                  | н/д                         |
| V<br>серозная high-grade<br>(SET-типа), n=1 | 50-71% | 50-80% | Мутантный<br>тип (mt) | 2-3+   | 60-67%                  | н/д                         |

**Таблица 4 - Экспрессия WT1, p53 и ARID1A(BAF250) в эпителии ДЭКОЯ в зависимости от уровня сывороточного СА 125**

| Уровень СА 125 в сыворотке крови, МЕ/мл | Экспрессия WT1                                                                    | Экспрессия p53                                                                    | Экспрессия ARID1A (BAF250a)                                                       |
|-----------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Менее 60 МЕ/мл                          |  |  |  |
| 61-90 МЕ/мл                             |  |  |  |
| 90-301 МЕ/мл                            |  |  |  |

В 2015 и 2019 годах **Wang Y. et al.** при проведении исследования с использованием иммуногистохимических маркеров OVGPI, WT1 и FMO3 показали, что серозная карцинома яичника low-grade развивается из трубного эпителия кистозных включений яичников. Аномальная экспрессия белка WT1 известна как маркер серозной дифференцировки, имеющий положительную экспрессию в серозных опухолях яичников (**Hatano Y., 2019, Rhodes A., 2017**). Исследование **Ma X. et al.** в 2016 г. показало, что мутация гена *PTEN* является ранним индикатором, а мутация p53 - поздним индикатором злокачественной трансформации эндометриоза. В настоящем исследовании также была обнаружена экспрессия p53 более 75% в 5 случаях с уровнем СА 125 в сыворотке крови 94,3-301 Е/мл, что может отражать серозную трансформацию эпителия, существующую в течение длительного времени, что, возможно, свидетельствует о начале неопластических изменений.

При статистическом анализе данных нами была выявлена сильная прямая зависимость между уровнем СА 125 в сыворотке крови и уровнем экспрессии WT1 в эпителии ДЭКОЯ (коэффициент корреляции Пирсона,  $r = 0,84$ ,  $p < 0,0001$ ), а также между уровнем СА 125 в сыворотке крови и уровнем экспрессии p53 (коэффициент



корреляции Пирсона,  $r = 0,81$ ,  $p < 0,0001$ ). При исследовании взаимосвязи между экспрессией WT1 и p53 в эпителии ДЭКОЯ была выявлена сильная прямая корреляция (коэффициент корреляции Пирсона,  $r = 0,79$ ,  $p < 0,0001$ ).

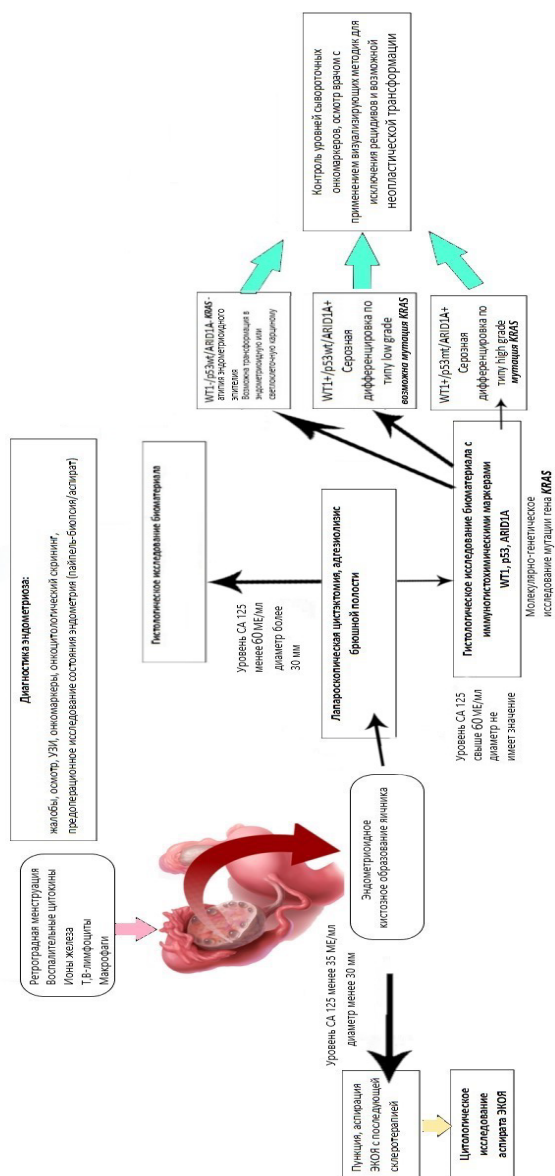
Согласно нашему исследованию, при сравнении иммунофенотипа ДЭКОЯ и карцином яичника, очаговая серозная дифференцировка эпителия ДЭКОЯ по типу low-grade: WT1+/p53+wt/*ARID1A*(BAF250a)+ с экспрессией серозных маркеров WT1 (20,7%) и p53 (31,7%) и по типу high-grade: WT1+/p53+mt/*ARID1A*(BAF250a)+ с экспрессией серозных маркеров WT1 (77%) и p53 (71,9%) наблюдалась с повышением уровня СА 125 более чем на 60 МЕ/мл. Эти данные свидетельствуют о неопластической трансформации в направлении серозных карцином яичника, так как эпителиоциты ДЭКОЯ имеют сходные иммуногистохимические профили с серозными карциномами яичников. При этом не наблюдалось сходства иммунофенотипа с эндометриоидными карциномами, так как в них экспрессия WT1 и p53 была или негативной, или очень слабой и очаговой. Кроме того, экспрессия *ARID1A*(BAF250a) в ДЭКОЯ была близка к таковой в серозных карциномах и отличалась от эндометриоидных. Согласно литературным данным, злокачественная трансформация ДЭКОЯ в эндометриоидную карциному может происходить при уровне СА 125 в пределах нормы в сыворотке крови (Журина И.Ю., 2017). По результатам нашего исследования мы предполагаем, что ДЭКОЯ может трансформироваться в серозную опухоль яичника и что этот процесс сопровождается повышением уровня сывороточного СА 125. Исходя из обнаруженных морфологических особенностей трансформации эндометриоидных кистозных образований, мы рекомендуем выполнение иммуногистохимического исследования с оценкой экспрессии p53 и WT1 и *ARID1A*(BAF250a), а также проведение молекулярно-генетического исследования мутаций гена *KRAS*, так как даже при нормальных значениях уровня СА 125 в сыворотке крови мы наблюдали мутацию гена *KRAS*. Данная панель антител достоверно выявляет нормальный эпителий (WT1-/p53+wt/*ARID1A*(BAF250a)+), серозную дифференцировку эпителия ДЭКОЯ по типу low-grade (WT1+/p53+wt/*ARID1A*(BAF250a)+), а в случае экспрессии p53 по мутантному типу и обнаружения мутации гена *KRAS* – возможность трансформации по типу high-grade

(WT1+/p53+mt/*ARID1A*(BAF250a)+). Кроме того, в случае если в эпителии произойдут изменения по типу потери экспрессии *ARID1A*(BAF250a), то можно сделать теоретический вывод о возможности трансформации по типу атипичного эндометриоза с профилем WT1-/p53+wt/*ARID1A*(BAF250a)-, с последующим возможным развитием эндометриоидной или светлоклеточной карциномы, что требует дальнейших исследований в этом направлении.

Эндометриоз, безусловно, не всегда является облигатным предраковым процессом для гетерогенной группы злокачественных опухолей яичника и частота малигнизации эндометриоидных поражений невысока. Тем не менее, учитывая высокую распространенность наружного генитального эндометриоза, необходимо проведение патогенетического лечения эндометриоза и долгосрочное наблюдение за данными пациентками. Для решения этой проблемы мы разработали алгоритм диагностики и принципов лечения пациенток с эндометриоидными кистозными образованиями яичника в зависимости от уровня сывороточного онкомаркера СА 125 и иммуногистохимического и молекулярно-генетического профиля (Рисунок 1).

Таким образом, использование иммуногистохимических маркеров WT1, p53 и *ARID1A*(BAF250a) в комплексе с молекулярно-генетическим исследованием мутации гена *KRAS* при морфологическом изучении операционного материала ДЭКОЯ позволяет диагностировать ранние изменения в эпителии и скорректировать последующее лечение пациенток в связи с возможностью неопластической трансформации таких образований. При этом механизм и неопластической трансформации все еще остается не до конца изученным и требует дальнейших исследований.

В случае, если методом лечения эндометриоидных кистозных образований яичников выбрана УЗИ-ассистированная аспирация, то в обязательном порядке проводится цитологическое исследование полученного содержимого. Основываясь на данных литературы, а также собственном опыте, цитологическое исследование аспиратов кистозных образований яичника имеет высокую точность при проведении дифференциальной диагностики между доброкачественными и злокачественными процессами в яичнике (Nagamine K., 2017).



**Рисунок 1 - Алгоритм диагностики и лечения пациентов с доброкачественными эндометриальными кистозными образованиями яичника**

При этом цитологическое исследование имеет ограниченное значение и может быть применено только в случаях полной уверенности врача в доброкачественности процесса, так как в данном исследовании выявлено, что и при нормальных уровнях СА 125 (31,3 МЕ/мл) могут в единичных случаях наблюдаться мутации гена *KRAS*, что, возможно, свидетельствует о раннем этапе развития атипичного эндометриоза либо серозной дифференцировки, что требует дальнейшего исследования в этом направлении на большем количестве клинического материала.

Таким образом, проведенное исследование показало необходимость дальнейшего изучения патогенеза эндометриоидных кистозных образований яичника и эндометриоз-ассоциированных опухолей, поиск новых иммуногистохимических и молекулярно-генетических маркеров, что позволит раскрыть взаимосвязь данных заболеваний и определить новые пути профилактики и лечения рака яичника у женщин с эндометриозом.

## ВЫВОДЫ

1. Установлено, что СА 125 в сыворотке крови пациенток с доброкачественными эндометриоидными кистозными образованиями яичников является надежным диагностическим маркером, подтверждающим «доброкачественное» течение заболевания при его концентрации 0-35 МЕ/мл. При уровне СА 125 36-60 МЕ/мл серозной дифференцировки эпителия не было обнаружено, но, начиная с уровня 61 МЕ/мл, в эпителии эндометриоидных кистозных образований яичника отмечалась тенденция к трансформации по серозному типу у 100% обследованных пациенток.
2. Существует сильная прямая корреляция между повышением сывороточного онкомаркера СА 125 свыше 60 МЕ/мл и изменениями иммунофенотипа по серозному типу low-grade (WT1+/p53+wt/*ARID1A*(BAF250a)+/*KRAS*-), где уровень ядерной экспрессии WT1 составил в среднем 20,7%, p53 — в среднем 31,7% и high-grade (WT1+/p53+mt/*ARID1A*(BAF250a)+/*KRAS*±), где уровень ядерной экспрессии WT1 составил в среднем 77%, p53 — в среднем 71,9% с 4 случаями экспрессии свыше 80%, что соответствует *mutant-type*,  $p < 0,0001$ . Эта корреляция может свидетельствовать о том, что эпителий ДЭКОЯ с серозной дифференцировкой продуцирует

гликопротеин СА 125, что способствует его повышению в сыворотке крови.

3. На основании клинико-морфологических, иммуногистохимических и молекулярно-генетических особенностей карцином яичников (эндометриоидных, серозных low-grade, серозных high-grade SET-типа) установлено, что иммунофенотип серозных карцином low-grade соответствовал иммунофенотипу доброкачественных эндометриоидных кистозных образований яичника при повышении СА 125 с 61 до 90 МЕ/мл: WT1+/p53+wt/*ARID1A*(BAF250a)+/*KRAS*-; иммунофенотип серозной карциномы high-grade (SET-типа) соответствовал иммунофенотипу доброкачественных эндометриоидных кистозных образований яичника при повышении СА 125 свыше 91 МЕ/мл: WT1+/p53+mt/*ARID1A*(BAF250a)+/*KRAS*±.

4. Наиболее значимыми иммуногистохимическими и молекулярно-генетическими маркерами ранней детекции неопластической трансформации доброкачественных эндометриоидных кистозных образований яичника следует считать диагностическую панель антител WT1, p53, *ARID1A*(BAF250a), а также молекулярно-генетическое исследование мутации гена *KRAS*.

5. На основании проведенного клинико-морфологического исследования разработан алгоритм клинико-морфологического, иммуногистохимического и молекулярно-генетического исследования операционного материала и лечения пациенток с доброкачественными эндометриоидными кистозными образованиями яичника зависимости от клинических данных пациентки и уровня сывороточного онкомаркера СА 125.

### **Практические рекомендации**

1. Аспирационная (склерозирующая) терапия доброкачественных эндометриоидных кистозных образований яичника с последующим цитологическим исследованием их содержимого может быть выполнена при отсутствии клинических и лабораторных признаков атипического процесса (уровень сывороточного онкомаркера СА 125 в пределах 35 МЕ/мл, диаметр ДЭКОЯ в пределах 30 мм), а также при рецидиве ДЭКОЯ после оперативного лечения с патоморфологической верификацией диагноза.

2. Особое внимание следует уделить патолого-анатомическому исследованию в полном объеме всего операционного материала

ДЭКОЯ от пациенток с неизвестным уровнем сывороточного СА 125 или уровнем свыше 60 МЕ/мл, в целях полноценного исследования эпителиального компонента. В направлении на прижизненное патолого-анатомическое исследование (ф № 014-1/у) должна быть дана информация об уровне сывороточного онкомаркера СА 125.

3. Операционный материал удаленных доброкачественных эндометриоидных кистозных образований должен быть в обязательном порядке отправлен на патоморфологическое исследование в сочетании с иммуногистохимическим маркированием с использованием предложенной панели антител: WT1, p53, *ARID1A*(BAF250a) и молекулярно-генетическим исследованием мутации гена *KRAS* в случае, если уровень сывороточного СА 125 неизвестен либо его уровень свыше 60 МЕ/мл.

4. В случае выявления серозной дифференцировки эпителия по типу low-grade/high-grade либо мутации гена *KRAS* необходимо установить наблюдение за такими пациентками с периодическим контролем уровня сывороточного СА 125 и использованием визуализирующих методов, так как существует вероятность неопластической трансформации в опухоль серозного типа.

#### **Список работ, опубликованных по теме диссертации**

*Статьи в журналах, входящих в Перечень РФ рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание учёной степени кандидата наук и учёной степени доктора наук*

1. Пацап О.И. К вопросу о маркерах ранней детекции эндометриоз-ассоциированных опухолей яичника. / Давыдов А.И., Михалева Л.М., Пацап О.И. // **Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии.** 2019; 18(4): 142–146. DOI: 10.20953/1726-1678-2019-4-142-146

2. Пацап О.И. Эндометриоз яичников: форма генитального эндометриоза или отдельная нозологическая единица? / Давыдов А.И., Михалева Л.М., Таирова М.Б., Пацап О.И. // **Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии.** 2019; 18(5): 5–12. DOI: 10.20953/1726-1678-2019-5-5-12

3. Пацап О.И. Роль цитологического исследования при склеротерапии эндометриом яичников / О.И. Пацап, М.Б. Таирова, А.И. Давыдов, Л.М. Михалева // **Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии.** - 2020. - Т. 19, № 2. - С. 5-10.

4. Patsap OI Malignant Transformation and Associated Biomarkers of Ovarian Endometriosis: A Narrative Review. / Mikhaleva LM, Davydov AI, Patsap OI, Mikhaylenko EV, Nikolenko VN, Neganova ME, Klochkov SG, Somasundaram SG, Kirkland CE, Aliev G. // **Advances in Therapy**. - 2020 -37(6). - P.2580-2603. DOI: 10.1007/s12325-020-01363-5
5. Patsap O.I. Novel clinical and morphological predictors of malignancy in patients with ovarian endometrioid cysts. / Mikhaleva L.M., Patsap O.I., Bezuglova T.V., Davydov A.I., Aliev G.M. // **Clinical and experimental morphology**. - 2021 - № 10(1). - С.21-31. DOI: 10.31088/CEM2021.10.1.21-31.

### *Другие публикации*

1. Пацап О.И., WT1 как предиктор неопластической трансформации эндометриоидных кистозных образований яичника. / Пацап О.И., Михалева Л.М., Давыдов А.И. // «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии». Сб.науч.трудов. С. 138-139. 12-13 ноября 2020 года. г. Москва
2. Пацап О.И. Маркеры неопластической трансформации эндометриоидных кистозных образований яичников / Пацап О.И., Михалева Л.М., Давыдов А.И. // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. - 2020. - №3(10). - С.112-113.

### **Патент на изобретение:**

Способ ранней диагностики неопластической трансформации эндометриоидных кист яичников // Патент России №2730952 от 26.08.2020 г./ Михалева Л.М., **Пацап О.И.**, Давыдов А.И.

### **Список сокращений:**

ДЭКОЯ – доброкачественные эндометриоидные кистозные образования яичника

SET-тип – подтип серозной опухоли яичника high-grade с морфологическим солидным строением, подобным эндометриоидной или переходно-клеточной опухоли, но с серозным иммунофенотипом

OVGP1 – яйцевод-специфичный протеин 1

WT1 – белок опухоли Вильмса 1

ФМОЗ – флавин-содержащая монооксигеназа 3

*ARID1A* – ген, кодирующий AT-содержащий интерактивный домен-содержащий протеин 1A

BAF250 – белковый продукт гена *ARID1A*

*KRAS* – ген, кодирующий белок RAS/MAPK пути

*BRAF* – v-Raf вирусный онкоген гомолог мышинной саркомы

*PTEN* – гомолог фосфатазы и тензина

p53 – белок p53

*TP53* – ген, кодирующий белок p53

CA 125 – карбогидратный/раковый антиген 125