

Государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Рязанский государственный медицинский университет
имени академика И.П.Павлова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Виноградов Илья Игоревич
МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-
БИОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
ПОГРАНИЧНЫХ ОПУХОЛЕЙ ЯИЧНИКОВ.

диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

14.03.02 – патологическая анатомия

Научные руководители:
доктор медицинских наук
Юлия Юрьевна Андреевна
доктор биологических наук
Лариса Эдуардовна Завалишина

Рязань, 2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений.....	3
ВВЕДЕНИЕ.....	4
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
Пограничные опухоли яичника. Общие сведения.....	11
История возникновения термина и вхождение его в классификацию.....	11
Эпидемиология и гистогенез.....	12
Морфологические характеристики.....	14
Молекулярно-биологические характеристики	27
Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.....	46
Материал исследования.....	46
Иммуногистохимическое исследование	49
Генетическое исследование.....	51
Статистическая обработка данных	54
Глава 3. АНАЛИЗ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ ПОГРАНИЧНЫХ ОПУХОЛЕЙ ЯИЧНИКОВ.....	55
Глава 4. АНАЛИЗ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ ПОГРАНИЧНЫХ ОПУХОЛЕЙ ЯИЧНИКОВ.....	69
Глава 5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	99
Морфологические факторы прогноза.....	99
Молекулярно-биологические факторы прогноза.....	104
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	114
ВЫВОДЫ.....	116
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОММЕНДАЦИИ.....	117
ЛИТЕРАТУРА.....	119

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

CIN – цервикальная интраэпителиальная неоплазия

СК – цитокератины

ММР – матриксная металлопротеиназы

TIMP – тканевые ингибиторы металлопротеиназ

ВАК – всероссийская аттестационная комиссия

ВКМ – внеклеточный матрикс

ВОЗ – всемирная организация здравоохранения

ГДФ – гуанозиндифосфат

ГТФ – гуанозинтрифосфат

ИГХ – иммуногистохимия

МПО – муцинозная пограничная опухоль

ПОЯ – пограничные опухоли яичников

СПО – серозная пограничная опухоль

ВВЕДЕНИЕ

Пограничные опухоли яичников (ПОЯ) – это особая группа новообразований, история изучения которых насчитывает уже более 80 лет, однако многие вопросы, касающиеся особенностей клинического течения, трудностей дифференциальной диагностики, поиска прогностически значимых факторов, до настоящего времени остаются либо не до конца изученными, либо не имеющими единого мнения в научных кругах. Впервые ПОЯ были описаны в 1929 году американским гинекологом Говардом Тейлором [197]. Он назвал эти опухоли «полузлокачественными», подчеркивая тем самым особенности их клинического течения, существенно отличающегося как от классического рака яичников, так и от доброкачественных образований.

Международной федерацией акушеров-гинекологов и Всемирной организацией здравоохранения пограничные опухоли как независимая группа заболеваний яичников были признаны лишь в 1973 году [37].

За всю историю своего изучения эти опухоли имели множество названий: «пограничная карцинома», «пограничная цистаденома», «пролиферирующая цистаденома без стромальной инвазии», «высокодифференцированная неинвазивная карцинома», «опухоль пограничной злокачественности» [175]. И только в классификации ВОЗ 2003 года был утвержден термин «пограничные опухоли яичников», который в настоящее время используется наиболее часто.

В структуре неоплазий яичников доля пограничных опухолей составляет около 10-15%, показатели заболеваемости варьируют в различных странах от 1,8 до 4,8 ‰. При этом, выживаемость на ранних стадиях приближается к 100% [51, 78]. Следует,

однако, отметить, что в России репрезентативные статистические данные по эпидемиологии пограничных опухолей крайне ограничены, поэтому в большинстве опубликованных работ представлены результаты зарубежных исследований. Одной из важных особенностей опухолей данной группы является тот факт, что по возрастным характеристикам ПОЯ отличаются от рака яичников, преимущественным выявлением у молодых женщин. Средний возраст больных на момент установления диагноза составляет 40 лет, при этом более чем в 30% наблюдений ПОЯ обнаруживают у пациенток в возрастном интервале 15-29 лет[50, 67, 189].

По мнению ряда авторов, одним из наиболее значимых факторов риска развития ПОЯ является бесплодие. В то время как беременность и лактация, напротив, обладают протективным эффектом. Таким образом, проблема ПОЯ может иметь социальной характер, особенно в России, где наблюдается спад рождаемости, который увеличивает риск развития и заболеваемость ПОЯ.

Среди гистологических типов, наиболее распространены серозная (45-50%) и муцинозная формы (25-30%) ПОЯ, реже встречается эндометриоидный вариант (3-18%), на долю оставшихся типов приходится менее 2% наблюдений [6, 21, 45, 60, 113, 177].

Большой клинический интерес представляет изучение первых двух подтипов ПОЯ, во-первых, в связи с их наибольшей распространенностью; во-вторых, это обусловлено тем, что результатами последних крупных научных исследований доказана связь серозных ПОЯ с наиболее частым гистологическим подтипом рака яичников – серозной аденокарциномой.

С другой стороны, не следует забывать о высоком удельном

весе женщин репродуктивного возраста в структуре заболеваемости этих опухолей. Вопросы сохранения фертильности занимают одно из центральных мест в планировании методов лечения данной патологии. В течение довольно долгого периода подход к лечению пациенток почти не отличался от рака яичников, выполнялась экстирпация матки с придатками, субтотальная резекция большого сальника с последующей химиотерапией. В связи с тем, что выживаемость больных с ПОЯ достаточно высокая, а чувствительность к применяемым химиопрепаратам крайне низкая, в последние годы в клиническую практику все шире внедряются органосохранные методы лечения. Однако число рецидивов заболевания после применения таких методик возросло [50, 78].

Это, в свою очередь требует поиска новых и тщательной оценки существующих факторов, влияющих на прогноз ПОЯ.

В настоящее время активно обсуждается прогностическая значимость некоторых морфологических особенностей ПОЯ, таких как гистологический вариант, наличие микроинвазии, образование микрососочковых структур и псаммомных телец.

Несмотря на немалое число исследований, единого мнения по целому ряду признаков не существует, а полученные данные нередко противоречивы, да и число наблюдений с большим сроком наблюдения за больными не велико. Очаги микроинвазии в опухоли выявляются в 10-15 % случаев у женщин в возрасте от 17 до 83 лет, средний возраст 34,5 года [46, 147]. Следует однако, упомянуть, что факт наличия микроинвазии в ПОЯ является очень дискуссионной проблемой из-за того, что часть авторов, рассматривают фокусы микроинвазии в качестве мелких очагов серозного инвазивного рака, развивающегося на фоне ПОЯ, изменяя диагноз а, следовательно, и подходы к лечению с приме-

нением схем, разработанных для лечения рака яичника. Между тем, результаты адъювантной химиотерапии при ПОЯ не удовлетворительные.

Для определения биологической агрессивности ПОЯ используют иммуногистохимические методы с применением широкой панели антител: белков-регуляторов клеточного цикла, молекул адгезии, индукторов апоптоза, и других [85, 86, 88, 94, 109]. К сожалению, до сих пор не удалось выявить спектр маркеров, позволяющих прогнозировать риск рецидива заболевания оценивать целесообразность выполнения органосохраняющих операций, особенно при наличии двустороннего поражения яичников.

Так же стоит отметить, что ПОЯ – одна из наиболее изученных групп опухолей с точки зрения генетических аспектов. Наиболее характерный мутационным профилем является наличие мутаций в генах *KRAS* и *BRAF*. Явных корреляций между наличием мутаций генов *BRCA* и риском развития пограничной опухоли в настоящее время не выявлено [35, 77, 171]. Тем не менее, значимость этих повреждений для прогноза ПОЯ не установлена. В настоящее время продолжаются активные поиски генетических факторов прогноза пограничных опухолей, как отечественными, так и зарубежными исследователями [118].

Таким образом, выявление морфологических, молекулярных и генетических признаков биологической агрессивности ПОЯ в свете оценки прогноза необходимы для последующей выработки эффективных способов лечения.

Целью настоящего исследования явилась оценка морфологических, иммуногистохимических и генетических факторов прогноза, выявление признаков биологической агрессивности пограничных опухолей яичника.

Для реализации цели исследования были сформулированы следующие **задачи**:

1. Оценить прогностическую значимость морфологических особенностей пограничных опухолей яичника, таких как формирование микрососочковой архитектуры и псаммомных телец;
2. Оценить значение имплантов при серозных пограничных опухолях и выяснить механизм возникновения их инвазивных подтипов;
3. Провести иммунофенотипический анализ пограничных опухолей с рецидивами и без рецидивов;
4. Оценить влияние наличия мутации в 15 экзоне гена *BRAF* на развитие рецидива пограничной опухоли яичника;
5. Выявить иммуногистохимические и молекулярно-генетические различия пограничных опухолей яичника и высокодифференцированных аденокарцином, развивающихся на их фоне.

Научная новизна

На основе анализа результатов проведенного комплексного исследования выявлены прогностические морфологические критерии, наиболее высокой значимостью из которых обладает наличие микрососочковой архитектуры (вероятность развития рецидива – 99,9%), так же, с прогнозом пограничных опухолей яичника значимо связано выявление имплантов (вероятность рецидива – 51,9%) и многочисленных псаммомных телец (вероятность рецидива – 30%).

Впервые установлена высокая диагностическая значимость иммуногистохимических маркеров, (металлопротеиназы MMP-1 и MMP-9, регулятор wnt-пути бета-катенин, индуктор апоптоза Вах, ингибитор металлопротеиназ TIMP-2), обладающих предик-

тивными возможностями и позволяющая планировать тактику ведения больных.

Изучена частота встречаемости мутации p.V600E в 15 экзоне гена *BRAF*, ответственного за пролиферацию и дифференцировку клеток в пограничных опухолях яичников и высокодифференцированных серозных карциномах. Получены данные о наличии мутации в гене *BRAF*, свидетельствующие об общности патогенеза и последовательности этапов канцерогенеза серозных новообразований яичников.

Практическая значимость

Разработан протокол гистологического заключения по исследованию операционного материала больных пограничными опухолями яичников, отражающий значимые параметры, необходимые для стадирования заболевания и определения тактики лечения.

Разработанная иммуногистохимическая панель, прогностических маркеров, включающая Ki-67, bcl-2, индуктор апоптоза Вах, циклин D1, ингибитор апоптоза сурвивин и ингибитор металлопротеиназ TIMP-1 дает новые возможности для дифференциальной диагностики пограничных опухолей яичника и высокодифференцированных карцином, развивающихся на их фоне. Выявление при микроскопическом исследовании таких прогностически значимых факторов как наличие микрососочковой архитектуры и псаммомных телец в опухолях, а так же применение иммуногистохимической панели, содержащей металлопротеиназы MMP-1, MMP-9, их ингибитор TIMP-2, бета-катенин и Вах позволяют оптимизировать лечебную тактику с учетом потенциальной биологической агрессивности опухоли, позволяют проводить дальнейшие клинико-морфологические сопоставления

для улучшения результатов лечения.

Внедрение в практику

Результаты исследования внедрены в научную и практическую работу Рязанского областного онкологического диспансера.

Опубликовано 6 научных работ по теме диссертации, в том числе 3 – в ведущих периодических изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Пограничные опухоли. Общие сведения

Пограничные опухоли (синоним: «опухоли с низким злокачественным потенциалом») – гетерогенная группа новообразований яичников, которая имеет промежуточные гистологические и цитологические особенности, по сравнению с таковыми у безусловно доброкачественных и безусловно злокачественных опухолей того же гистотипа.

Для пограничных опухолей характерна пролиферация эпителия, клеточная и ядерная атипия, выраженная в большей степени, чем в их доброкачественных аналогах. Однако отсутствует деструктивная инвазия стромы или солидный рост, что в свою очередь связано с более благоприятным прогнозом пограничных опухолей по сравнению с раком яичников [158, 178, 186, 209].

История возникновения термина и вхождение его в классификацию

Впервые пограничные опухоли яичников были описаны в 1929 году американским гинекологом Говардом Тейлором [197]. Он назвал эти опухоли «полузлокачественными», подчеркивая тем самым особенности их клинического течения, существенно отличающиеся как от классического рака яичников, так и от доброкачественных новообразований.

В 1973 году пограничные опухоли были признаны Международной федерацией акушеров-гинекологов и Всемирной организацией здравоохранения как независимая группа заболеваний яичников [37]. Термин «пограничные опухоли яичников» опубликован в классификации ВОЗ в 2003 году и в настоящее время используется наиболее часто. В качестве синонима используется понятие «опухоли яичников низкой степени злокачественности».

Другие варианты названий, такие как «пограничная карцинома», «пролиферирующая цистаденома без стромальной инвазии», «высокодифференцированная неинвазивная карцинома» и «опухоль пограничной злокачественности» в настоящее время исключены из медицинской терминологии, поскольку они не соответствуют современным представлениям о природе данных новообразований [60].

Хотя слово «пограничный» может внушить неуверенность, оно точно описывает неоднозначные гистологические и биологические особенности этих опухолей и остается самым адекватным названием.

Эпидемиология и гистогенез

В структуре неоплазий яичников доля пограничных опухолей составляет около 10-15%, показатели заболеваемости варьируют в различных странах от 1,8 до 4,8 ‰. Следует отметить, что в России репрезентативные статистические данные по эпидемиологии пограничных опухолей крайне ограничены, поэтому в большинстве работ, опубликованных в литературе, представлены результаты зарубежных исследований. По возрастным характеристикам пограничные опухоли существенно отличаются от рака яичников, так как обычно поражают молодых женщин. Средний возраст больных на момент установления диагноза составляет 40 лет, при этом более чем в 30% наблюдений ПОЯ выявляют у пациенток в возрастном интервале 15-29 лет [50, 67, 189]. Выживаемость пациенток с ПОЯ на 1 стадии, по последним литературным данным не отличается от общей популяции и приближается к 100% [33]. Очаги микроинвазии в опухоли выявляются в 10-15 % случаев у женщин в возрасте от 17 до 83 лет, средний возраст 34,5 лет [46, 196].

По мнению ряда авторов, одним из наиболее значимых факторов риска развития ПОЯ является бесплодие. Беременность и лактация, напротив, обладают протективным эффектом. Явных корреляций между наличием мутаций генов *BRCA* и риском развития пограничной опухоли в настоящее время не выявлено [35, 77, 171].

Пограничные опухоли развиваются из поверхностного эпителия яичников или кист-включений. В соответствии с видами эпителия, выделяют следующие гистологические подтипы пограничных опухолей: серозные, муцинозные, эндометриоидные, светлоклеточные, переходноклеточные (опухоль Бреннера) и смешанные.

Наиболее распространены серозная (45-50%) и муцинозная формы (25-30%), реже встречается эндометриоидный вариант (3-18%), на долю оставшихся типов приходится менее 2% наблюдений [6, 21, 45, 60, 99, 113, 135, 177]. В связи с этим биологическое поведение светлоклеточных и переходноклеточных опухолей практически не изучено [99, 135].

Следует отметить, что муцинозные опухоли яичников, ассоциированные с псевдомиксомой брюшины, в настоящее время рассматриваются как метастатические, так как в большинстве случаев прослеживается связь с первичной опухолью аппендикса [44, 60, 220].

Молекулярно-генетические исследования последних лет, направленные на изучение овариального канцерогенеза существенно изменили представление о происхождении пограничных опухолей [200].

Проведенные исследования в этой области указывают на различие генетического профиля серозных пограничных опухолей и обычных серозных карцином. Высокодифференцированные

(low-grade) серозные карциномы имеют идентичный генетический профиль с серозными пограничными опухолями, а именно частые мутации *BRAF/KRAS*, но редкие *TP53*- мутации. Напротив, при серозных низкодифференцированных (high-grade) карциномах мутации *BRAF/KRAS* редки, тогда как мутации *TP53* встречаются приблизительно в 60 % случаев [65, 82].

Мутации *BRAF/KRAS*, кроме того, были обнаружены в эпителии цистаденом, что подтверждает гипотезу о последовательной прогрессии от аденомы к пограничной опухоли, и затем к low-grade карциноме [141, 142].

Наибольший интерес представляют серозные пограничные опухоли из-за их частой встречаемости. Кроме того для пограничных опухолей данного подтипа характерна высокая частота двухстороннего поражения, варьирующая от 28 до 66%, тогда как билатеральное поражение у больных муцинозной пограничной опухолью встречается в среднем в 10% наблюдений [11, 44].

При пограничных опухолях, как и при раке яичников, обсуждаются два потенциальных пути метастазирования – имплантационный и лимфогенный. Перитонеальная диссеминация на момент постановки диагноза определяется у 35-38% больных с серозными пограничными опухолями и у 10-15% с муцинозными. Частота поражения лимфатических узлов варьирует от 7 до 29%, отдаленные метастазы встречаются достаточно редко [51, 183, 202].

Морфологические характеристики

Макроскопически серозные пограничные опухоли обычно выглядят как одна или несколько кист, которые выстланы полиповидными разрастаниями различной степени выраженности с плотно упакованными тонкими сосочками. Диаметр кист может

колебаться от 5 до 40 см [189]. Кисты могут содержать густую муцинозную жидкость, которая не обязательно указывает на муцинозную природу опухоли. Полиповидные разрастания имеют волокнистую или отечную строму. Пограничные серозные цистаденофибромы представляют собой опухоли плотной консистенции, беловато-серого цвета, волокнистого вида, с кистозным компонентом различного размера. Почти в половине случаев сосочковые разрастания выявляются по поверхности яичника (серозная поверхностная папиллярная пограничная опухоль) [180]. Часто присутствуют и экзофитный и эндофитный сосочковые компоненты. Типичные макроскопические особенности серозных карцином, такие как хрупкость, кровоточивость и некроз, отсутствуют при пограничных серозных опухолях.

При микроскопии в серозных пограничных опухолях выявляются стромальные полиповидные разрастания, желез, и сосочков, выстланные стратифицированным кубическим или столбчатым эпителием, с наличием реснитчатых клеток, напоминающим эпителий маточной трубы. Большие клетки типа сапожного гвоздя с обильной эозинофильной цитоплазмой и мезотелиоподобные клетки могут также присутствовать. При наличии микроинвазии эозинофильные клетки увеличиваются в размерах. Степень ядерной атипии эпителия может меняться от слабой до умеренной (редко до тяжелой). Митозы редки. Псаммомные тельца обнаруживаются приблизительно в одной четверти случаев.

Наиболее важными диагностическими особенностями серозных пограничных опухолей являются:

1. Разветвляющиеся сосочки, которые формируют постепенно уменьшающиеся ветви, заканчивающиеся гроздьями эпителиоцитов, которые, как кажется, отделены от стромы (иерар-

хическая структура ветвления);

2. Различная степень ядерной атипии;

3. Отсутствие явной стромальной инвазии или солидных пластов с крибриформными структурами [178].

Нередко возникают трудности при постановке диагноза серозной ПОЯ, связанные с наличием псевдоинвазии, микрососочковых структур, микроинвазии, гиперплазии мезотелия, а так же наличием перитонеальных имплантов и опухолевых комплексов в лимфатических узлах.

Серозные пограничные опухоли часто имеют относительно сложную пролиферацию желез и сосочков. Железы нередко инвагинируют в строму и, особенно при тангенциальных срезах, могут имитировать инвазию [178]. Эта псевдоинвазия отличается от деструктивной стромальной инвазии при раке. Строма вокруг псевдоинвазии подобна строма в других местах, а железы имеют правильное расположение. При раке инвазия типично формирует десмопластическую строму, а опухолевые клетки расположены более беспорядочно. Иногда серозные пограничные опухоли могут быть частично покрыты фиброзными спайками, связанными с гиперплазией мезотелия, которая может ошибочно интерпретироваться как поверхностная пограничная опухоль или даже рак. Мезотелиальные клетки, однако, не имеют ядерной атипии и, как правило, располагаются линейно.

В серозных пограничных опухолях может быть обнаружена, обильная и хрупкая микропапиллярная (или фокальная крибриформная) пролиферация без деструктивной стромальной инвазии. Иногда этот тип роста принимается за «микрососочковую серозную карциному», потому, что согласно ряду авторов, она часто связана с агрессивным поведением [58]. Большинство исследователей не разделяет эту точку зрения и предпочитает на-

зывать это серозной пограничной опухолью с микрососочковой структурой или микрососочковой серозной пограничной опухолью [32, 38, 131, 148, 149, 159, 183]. В отличие от типичной серозной пограничной опухоли, для которой свойственна различная степень пролиферации клеток и ядерной атипии, микрососочковая или крибриформная опухоль имеет заметную однородную степень пролиферации и ядерной атипии. Большинство микрососочковых опухолей содержит области типичной серозной пограничной опухоли, что, вероятно, указывает на этапность их развития [58].

Последние исследования показали, что билатеральное поражение, рост по поверхности яичника, и поздняя стадия (неинвазивные импланты) больше характерны для микрососочковых серозных пограничных опухолей, чем для типичных, но явная связь этих опухолей с инвазивными имплантами и плохим прогнозом была противоречивой [32, 38, 103, 131, 148, 149, 159].

Хотя в трех из этих исследований микрососочковые серозные пограничные опухоли более часто ассоциировались с инвазивными имплантами, наличие микрососочковой архитектуры не оказало значимого неблагоприятного эффекта на общую выживаемость [131, 148, 149]. Результаты этих исследований укрепили представление о том, что прогноз при микропапиллярной пограничной опухоли более схож с таковым при типичной серозной пограничной опухоли (СПО), чем при карциноме. Иммуногистохимические и молекулярно-генетические исследования продемонстрировали различия между типичными СПО, микрососочковыми СПО и высокодифференцированными серозными карциномами [133]. Иммуногистохимическая реакция с p53 является слабой или фокальной при серозных пограничных опухолях, умеренной или диффузной при микрососочковых серозных

пограничных опухолях и интенсивной в большинстве серозных раков. В обычных серозных пограничных опухолях и микрососочковых СПО мутации *TP53* выявляются редко, по сравнению с серозными карциномами, у которых данные мутации были обнаружены в двух третях случаев [133]. Аналогичные исследования сравнительной геномной гибридизации показали больший хромосомный дисбаланс в микрососочковых СПО, чем в типичных серозных пограничных опухолях и меньший, чем в серозных карциномах [132]. Эти данные, в какой-то мере свидетельствуют, что микрососочковые серозные пограничные опухоли представляют собой промежуточное звено неопластической трансформации между серозной пограничной опухолью и серозной карциномой. По аналогии с цервикальной неоплазией, различие между типичной серозной пограничной опухолью и микрососочковой серозной пограничной опухолью походит на таковое между CIN 2 и CIN 3. Хотя микрососочковая структура в комбинации с другими клиническими и патологическими особенностями (поздняя стадия, инвазивные импланты, микроинвазия) может быть связана с увеличенным риском прогрессии болезни, сами по себе микропапиллярные структуры не являются специфическим показателем неблагоприятного прогноза [149].

Приблизительно 5-13 % серозных пограничных опухолей содержат один или несколько фокусов стромальной микроинвазии, которые состоят из единичных эпителиальных клеток или мелких групп клеток с богатой эозинофильной цитоплазмой [45, 61, 103, 112, 127, 129, 149, 159, 196]. Нередко гнезда этих клеток окружены щелями, которые отделяют эпителий от стромы. Эти микроскопические фокусы (не превышающие 10мм² по площади или 3мм в наибольшем линейном измерении) обычно не связаны со значительной стромальной реакцией и могут быть пропущены

при рутинном гистологическом исследовании [178]. Иммуногистохимическое (ИГХ) исследование с антителами к цитокератинами помогает визуализировать инвазивные клетки. Изредка встречаются фокусы инвазии прилежащего лимфатического сосуда [46].

Серозные пограничные опухоли с микроинвазией ассоциированы с более высокой частотой двухстороннего поражения, экзофитного роста по поверхности яичника и поздней стадией, в отличие от типичных СПО без микроинвазии. При этом общее количество инвазивных имплантов аналогично в обеих группах [159]. Поэтому ряд авторов предполагает, что микроинвазия может представлять собой фактор риска прогрессии болезни, независимый от стадии и наличия имплантов [127, 149].

Однако в нескольких исследованиях было показано, что хотя для серозных пограничных опухолей с микроинвазией и характерно наличие более ранних рецидивов, это не ухудшает общую выживаемость в сравнении с типичными СПО без микроинвазии [61, 103].

Экстраовариальные очаги пограничных опухолей, расположенные на париетальной и висцеральной брюшине получили название «имплантов». Данный термин сформировался исторически и не отражает реальной сути патологических изменений, однако продолжает использоваться и в настоящее время. Это связано с тем, что вопрос о происхождении имплантов продолжает активно дискутироваться. В частности, одни авторы считают, что импланты действительно являются метастазами пограничной опухоли, другие придерживаются мнения о независимом их развитии из мультицентричных зачатков опухоли по брюшине.

Перитонеальные импланты встречаются у 30-40% больных с ПОЯ [38, 47, 112, 147, 149, 159, 182, 183, 184]. Наиболее часто

они обнаруживаются у пациентов с опухолями, имеющими экзофитный компонент [180]. Импланты редко проявляются объемным поражением, и в большинстве случаев, представлены или микроскопическими или мелкими макроскопическими ($\leq 1-2$ см) очагами. Их гистологическая картина может значительно варьировать, колеблясь от фокусов доброкачественного железистого эпителия, похожего на эндосальпингоз, неинвазивных сосочков, узелков пограничного эпителия и стромы, до инвазивных имплантов, напоминающих серозную low-grade карциному [47].

Гистологически импланты классифицируют на неинвазивные и инвазивные [47]. Чаще выявляют неинвазивные импланты (75%), которые подразделяются на десмопластические, эпителиальные и смешанные подтипы. Эпителиальные неинвазивные импланты представлены сосочковой пролиферацией атипичных эпителиальных клеток, напоминающих таковые при серозной пограничной опухоли; они, как правило, присутствуют на поверхности брюшины или ее инвагинатах, стромальная реакция отсутствует, или слабо выражена [47].

Напротив, десмопластические импланты в значительной степени представлены пролиферацией стромы, которая расположена на серозной поверхности или в инвагинациях между жировыми дольками сальника. Строма при десмопластических имплантах количественно превосходит эпителиальный компонент. Со временем мелкие железы и сосочки, выстланные атипичными серозными клетками, так же как псаммомные тельца замещаются плотной фиброзной тканью, часто инфильтрированной воспалительными элементами.

Кроме того импланты имеют способность формировать обширные очаги фиброза в брюшной полости в результате десмоплазии, нередко приводящие к развитию кишечной непроходимости.

мости и, как это ни парадоксально, возможность спонтанной регрессии после удаления первичного очага [44, 51, 60, 202].

Инвазивные импланты наблюдаются в 12-25% случаев и только при серозном варианте пограничной опухоли [38, 47, 148, 149, 159]. Они проявляются беспорядочной инфильтрацией нормальных тканей, таких как сальник; в отличие от неинвазивных имплантов, имеют нечеткие контуры. Инвазивные импланты обычно представлены большими группами эпителиальных клеток и гистологически напоминают low-grade серозную аденокарциному; может присутствовать заметная цитологическая атипия [47].

В связи с тем, что клинические и морфологические особенности инвазивных имплантов аналогичны таковым при метастазах рака яичников, многие авторы предлагают рассматривать пограничные опухоли с инвазивными имплантами как высокодифференцированные серозные аденокарциномы.

Разделение имплантов на инвазивные и неинвазивные подтипы имеет важное прогностическое значение. Именно наличие инвазивных имплантов при пограничной опухоли оказывает существенное влияние на выживаемость больных. Так, 10-летняя выживаемость пациенток с неинвазивными имплантами пограничных опухолей составляет 90-95%, с инвазивными – 60-70% [44, 51, 60, 202]. Описанные в литературе, редкие пограничные опухоли яичника с летальным исходом, сопровождались главным образом инвазивными перитонеальными имплантами [47, 112, 147, 148, 149, 154, 159, 182, 184, 185].

Муцинозные пограничные опухоли (МПО) яичника разделены на два вида: опухоли эндоцервикального и интестинального типов, составляющие 15% и 85 % от всех МПО, соответственно [178] .

Макроскопически эти опухоли мало чем отличаются от серозных пограничных опухолей. Образование, как правило, представлено полостью состоящей из одной или нескольких камер, заполненных вязкой муцинозной жидкостью в большинстве из которых имеется определяемый глазом сосочковый компонент, который, однако, выражен в меньшей степени, чем при серозных пограничных опухолях. Муцинозные опухоли так же имеют более крупные размеры, чем серозные и их средний диаметр составляет 10-19 см [115]. Частота билатерального поражения колеблется от 12 до 40% [80, 140, 172, 176]. Визуально опухоль может быть неотличима от муцинозной цистаденомы и цистаденокарциномы. Эти опухоли требуют большой выборки макроматериала для гистологического исследования (особое внимание должно быть уделено солидным участкам), так как различный уровень клеточной пролиферации и ядерной атипии встречается часто в пределах одного образования [100].

Для МПО эндоцервикального типа характерно наличие сосочков, архитектурно схожих с сосочками серозных пограничных опухолей. Внутренняя стенка кисты выстлана столбчатыми, богатыми муцином клетками, которые напоминают клетки эндоцервикса. Верхушки сосочков покрыты полигональными клетками с обильной эозинофильной цитоплазмой [176]. Могут встречаться эндометриоидные и реснитчатые серозные клетки, при отсутствии областей кишечной дифференцировки. Характерна умеренная, иногда выраженная атипия ядер. Митозы редки. Деструктивной инвазии стромы не наблюдается. Лишь немногие опухоли имеют фокусы микрососочкового роста, напоминающего микрососочковую архитектуру серозных пограничных опухолей [80]. Так же для муцинозной опухоли характерна лейкоцитарная полиморфноклеточная инфильтрация эпителия, стромы

сосочков и внеклеточного внутрипросветного муцина. Муцинозные пограничные опухоли эндоцервикального типа могут быть ассоциированы с тазовыми или брюшными имплантами (3-20 %), некоторые из которых имитируют инвазию [172,176]. Однако малое количество случаев МПО с наличием имплантов не позволяет категорично судить об их поведении [146, 176].

Муцинозные пограничные опухоли кишечного типа состоят из кист и желез, выстланных атипичным эпителием желудочно-кишечного типа. Кисты могут содержать тонкие ветвящиеся сосочки. В эпителиальной выстилке, имеющей обычно 2-3 слоя, почти всегда имеются кубические клетки, встречаются аргирофильные клетки и, редко, клетки Панета. Ядерная атипия слабая или умеренная, митотическая активность может варьировать. Стромальная инвазия отсутствует. По виду опухоль может напоминать гиперпластический или аденоматозный полип толстой кишки. Большинство опухолей также содержит фокусы доброкачественного муцинозного эпителия, который напоминает эндоцервикальный или желудочный эпителий. Иногда внеклеточный муцин может пропитывать строму и вызывать гранулематозное воспаление с наличием гистиоцитов и гигантских клеток типа инородных тел (муциновая гранулема). Нередко встречаются фокусы некроза с острой воспалительной реакцией.

Неинвазивные МПО кишечного типа могут иметь выраженную пролиферацию эпителия с наличием четырех и более его слоев, наряду с фокусами крибриформной или сосочковой архитектуры, а так же, умеренную или тяжелую ядерную атипию. До сих пор не существует единого мнения, как классифицировать такие опухоли: как неинвазивную карциному или как пограничную опухоль с интраэпителиальной карциномой [100]. Однако, проведенные исследования показали, что эти опухоли, практи-

чески всегда клинически проявляются как чисто пограничные опухоли [49, 104, 115, 170, 173]. В связи с этим часть исследователей рекомендует расценивать такие новообразования как муцинозные пограничные опухоли с интраэпителиальной карциномой, основывая свой диагноз на степени ядерной атипии [178, 209]. Крибриформно-подобные структуры пограничной опухоли, обусловленные тангенциальными срезами, не должны интерпретироваться как интраэпителиальный рак при отсутствии в них выраженной ядерной атипии [100].

Иммунофенотип муцинозных опухолей эндоцервикального и интестинального типов различен. В эндоцервикальном типе выявляются рецепторы эстрогена и прогестерона, СА125, мезотелин и WT1 [145]. В опухолях интестинального типа экспрессируются СК20 и РЭА [134]. Положительная реакция с СК7 характерна для обоих типов.

Пограничные опухоли яичника стадируют по тем же принципам, что и злокачественные опухоли яичника с использованием систем TNM и FIGO. При I стадии опухоль ограничена одним или обоими яичниками, при II стадии имеется распространение опухоли на структуры малого таза, III стадия характеризуется распространением опухоли за пределы малого таза и/или вовлечением регионарных лимфатических узлов, при IV стадии имеются отдаленные метастазы. Благодаря своему длительному торпидному течению, пограничные опухоли яичника в большинстве случаев (60-85%) диагностируют на I стадии болезни, при этом муцинозные формы чаще не имеют экстраовариальных очагов, в отличие от серозных (80-84% и 60-70% соответственно). Частота выявления 3 стадии составляет 10-35%, в отличие от рака яичников, при котором аналогичный показатель соответствует 60-70%. Случаи обнаружения 4 стадии заболевания крайне редки

[189]. В частности, Tinelli R. et al. (2006) провели анализ группы из 948 больных с пограничными опухолями: у 70% пациенток выявлена 1 стадия процесса, у 10% - 2 стадия, в 19% наблюдений – 3, и только в 1% - 4 стадия болезни [67].

Особенности биологии пограничных опухолей яичников и преобладание начальных форм опухолевого процесса предопределяет благоприятный прогноз для больных. Если в течение последних десятилетий в результате применения новейших схем лечения удалось приблизить показатели общей пятилетней выживаемости при раке яичников к рубежу в 50%, то выживаемость больных с пограничными опухолями остается достаточно стабильной и превышает 95% (табл. 1.1) [207].

Таблица 1.1

Пяти- и десятилетняя выживаемость больных с пограничными опухолями яичников в зависимости от стадии заболевания

Стадия (FIGO)	5-летняя выживаемость (%)	10-летняя выживаемость (%)
I	99	97
II	98	90
III	96	88
IV	77	69

Стандартным объемом хирургического лечения, выполняемого при пограничных опухолях яичников является экстирпация матки с придатками, оментэктомия, проведение хирургического стадирования и удаление всех видимых опухолевых очагов при распространенных стадиях. Благоприятный прогноз, низкая частота рецидивирования (по данным разных авторов 0-20%) и впе-

чатляющие показатели выживаемости, безусловно, создают предпосылки для применения органосохраняющего лечения пограничных опухолей, в отличие от рака яичника, особенно, учитывая высокий удельный вес женщин репродуктивного возраста в структуре заболеваемости пограничными опухолями яичника [27, 50, 62, 67, 68] .

Наиболее частый вариант органосохраняющих операций при пограничных опухолях яичников – односторонняя овариоэктомия или аднексэктомия с резекцией контралатерального яичника и оментэктомия в сочетании с проведением хирургического стадирования. Необходимость резекции большого сальника при клинической I стадии опухолевого процесса связана высокой частотой выявления микрометастазов, достигающей 18,9-21% [11].

Планирование органосохраняющего лечения у молодых пациенток диктует необходимость поиска новых и оценки существующих прогностических факторов при пограничных опухолях яичников.

Наиболее важным прогностическим фактором при ПОЯ является стадия опухолевого процесса. Известно, что у больных с начальными формами болезни рецидивы развиваются в среднем у 5%, при распространенных стадиях – в 25% случаев, а пятилетняя выживаемость при 1-2 и 3-4 стадиях составляет 98 и 82-90% соответственно [51, 78].

Наличие перитонеальных имплантов, особенно инвазивных, является вторым по значимости прогностическим фактором. По своему строению и клиническому течению инвазивные импланты очень схожи с метастазами рака яичников и могут служить маркером злокачественной трансформации пограничной опухоли. По данным Morice P. (2003) рецидивы при инвазивных имплан-

тах наблюдаются в два раза чаще, чем при неинвазивных (45% против 24%) [161].

Некоторые авторы связывают высокий процент рецидивов с наличием микроинвазии, выявляющейся у 10-13% больных. Однако другие авторы рассматривают такие опухоли не как серозные пограничные опухоли с микроинвазией, а как мелкие очаги инвазивного серозного рака, развивающегося на фоне пограничной опухоли, и указывают, что данное обстоятельство должно служить поводом к изменению диагноза в пользу рака яичников с применением более агрессивной лечебной тактики [51, 84].

Убедительных данных о том, что гистологический тип опухоли или вовлечение в процесс лимфатических узлов являются независимыми прогностическими факторами, получено не было. Так, проведенный метаанализ 97 исследований, включавший более 4000 больных с ПОЯ, показал, что 6-и летняя выживаемость больных с поражением лимфатических узлов составляет 98% [165, 181].

Молекулярно-биологические характеристики

Одним из современных путей прогнозирования и течения опухолей яичников и выработки лечебной тактики является изучение молекулярно-биологических маркеров в ткани опухоли [1, 2, 4, 10, 13, 14, 15, 19, 22, 23, 24].

Значительный прогресс в понимании механизмов канцерогенеза, в том числе и ПОЯ, связан с открытием онкогенов, протоонкогенов, а так же генов-супрессоров опухолевого роста и мутаторных генов [9].

Онкогены – это клеточные или вирусные (вносимые вирусом в клетку) гены, экспрессия которых может привести к развитию новообразования. Протоонкогены – это нормальные кле-

точные гены, усиление или модификация функции которых превращает их в онкогены.

Опухолевые супрессоры (антионкогены) – клеточные гены, инактивация которых резко увеличивает вероятность возникновения новообразований, а восстановление функции, наоборот, может подавить рост опухолевых клеток. Следует заметить, что мутаторные гены, причисляемые к опухолевым супрессорам, это гены, нарушение функции которых тем или иным способом увеличивает темп возникновения мутаций и/или других генетических изменений, хотя прямого влияния на рост неопластических клеток они не имеют. Однако их инактивация столь сильно увеличивает вероятность появления различных онкогенных мутаций, что образование опухоли становится лишь вопросом времени [28].

Последние десятилетия характеризуются бурным открытием новых онкогенов и опухолевых супрессоров. Однако долгое время знания о каждом из онкогенов или опухолевых супрессоров представлялись не связанными между собой. И лишь в последние годы стала вырисовываться общая картина, показывающая, что большинство известных протоонкогенов и опухолевых супрессоров являются компонентами нескольких общих сигнальных путей, контролирующих клеточный цикл, апоптоз, целостность генома, морфогенетические реакции и дифференцировку клеток. Изменения в этих сигнальных путях, в конце концов, приводят к развитию опухолей.

Хотя наше понимание молекулярных механизмов ответственных за биологическое поведение опухолей яичника остается неполным, предположение о том, что рак яичника, как и большинство других раков, возникает в результате нарушений в регулировании клеточного цикла, было сделано давно [85].

Более актуальные данные показали, что аберрация компонентов контрольных точек клеточного цикла, которые играют важную роль в пролиферации клетки, является общей чертой многих опухолей.

Первая контрольная точка клеточного цикла осуществляет регуляцию перехода клетки из G1 в S-фазу, вне которой митогенная передача сигналов больше не требуется и клетка завершает цикл своей репликации. Ведущими факторами, управляющими переходом клетки в S фазу, являются циклин D1 и циклин-зависимые киназы (CDKs) 4 и 6. Комплекс, образуемый циклином и CDK4 или CDK6, активизируется CDK-активирующей киназой, приводя к гиперфосфорилиции белка ретинобластомы (pRb) вызывая транскрипцию генов, необходимых для прогрессии клеточного цикла. Напротив, ингибиторы CDK (CKIs) (p16, p21, p27) воздействуя на комплекс cyclin/CDK, предотвращают прогрессию цикла клетки.

Во всех активных фазах клеточного цикла (G1, S, G2, и M. фазы) в ядре определяется протеин **Ki-67**, массой 345-395 kDa, кодируемый геном *MKI67*. Его уровень начинает расти в середине G1 фазы, постепенно увеличивается при переходе из S в G2 фазу и достигает своего пика в митозе.

По окончании M-фазы Ki-67 быстро катаболизируется и, таким образом отсутствует в G0-фазе [106]. Благодаря этому антиген Ki-67 стал важнейшим клеточным маркером для оценки пролиферативной активности.

В области яичникового рака были проведены различные исследования относительно корреляции между экспрессией Ki-67 и клиническими параметрами, но результаты являются все еще противоречивыми.

Некоторые исследователи сообщали, что высокий уровень Ki-67 коррелировал с плохим прогнозом, другие же сообщают об отсутствии корреляции ни с прогностическими параметрами, ни с выживаемостью при ПОЯ [31, 205]. В отдельных исследованиях показано увеличение степени пролиферативной активности от пограничной опухоли яичников к low-grade карциноме и, затем к high-grade карциноме [85].

Cyclin D1 (PRAD-1, bcl-1, CCND1) – протоонкоген, обнаруженный первично при аденоме паращитовидной железы [34, 157]. Циклин D1 является положительным регулятором клеточного цикла [73]. Этот белок гиперэкспрессируется в лимфомах, особенно мантийноклеточной, волосатоклеточном лейкозе, и при множественной миеломе [70, 72, 74, 76, 187, 203, 211].

Так же его гиперэкспрессия описана и в эпителиальных опухолях, таких как рак желудка, легкого, молочной железы, а так же плоскоклеточный рак различных локализаций [71, 81, 125, 136, 214].

По данным ряда авторов в 13-56 % случаев рака яичников выявляется амплификация или гиперэкспрессия циклина D1, либо их сочетание [75, 92, 218]. При этом гиперэкспрессия может встречаться в отсутствии амплификации или мутаций [30]. В исследовании Dhar не было выявлено значительного различия между уровнем циклина D1 и дифференцировкой опухоли, стадией болезни, и выживанием [163]. Однако, в литературе есть сообщения о более высокой экспрессии при раке яичников на продвинутых стадиях и о низкой экспрессии в high-grade опухолях [75, 92, 199, 218].

В современных исследованиях опухолевый рост рассматривается как результат дисбаланса между пролиферацией клеток и

апоптозом – запрограммированным процессом гибели клеток [3, 8, 16, 20, 25]. Смерть клетки как естественный запрограммированный природный процесс, не связанный с патологией, впервые был описан почти полвека назад, а термин «апоптоз» предложил Ю. Керр и соавторы. Принято считать, что основное предназначение апоптоза как физиологического процесса – поддержание постоянного количества клеточных элементов в органах и тканях организма и удаление клеток, прошедших свой жизненный цикл.

В отличие от пассивного некроза апоптоз является активным процессом, находящимся под генетическим контролем. Его важной особенностью является то, что удаление умирающих клеток происходит без развития воспаления.

В настоящее время считается, что регулирование апоптоза происходит так же комплексно, как и регулирование пролиферации клеток. Для выявления апоптоза используют микроскопию, гистохимические и иммунохимические реакции.

К маркерам апоптоза в клеточных популяциях относят семейство протеинов bcl, супрессор опухолевого роста p53 и др. [12, 13, 14, 29].

Апоптоз может быть включен множеством внутренних и внешних сигналов и направлен на освобождение от старых или наработанных в избытке клеток, а так же от клеток с нарушениями дифференцировки и повреждением генетического вещества. Он может быть инициирован как внутриклеточными сигналами, регулирующими уровень p53, и также внеклеточными сигналами, опосредованными комплексом Bax/bcl-2. Снижение способности к апоптозу у опухолевых клеток играет существенную роль в развитии многих новообразований, однако осуществляется это с помощью различных механизмов, анализ которых

может быть полезен для оценки существующих и поиска новых путей подавления опухолевого роста.

Одним из механизмов поломки апоптоза в опухолевых клетках является мутация в генах, контролирующих суицидальную программу. В связи с этим активно исследуется экспрессия белка p53, так как доказано, что онкогенная трансформация клетки часто сопровождается мутацией в гене *TP53* и превращением его из индуктора в ингибитор апоптоза [67, 189, 192].

TP53 – ген-супрессор опухоли, расположенный в коротком плече 17 хромосомы. Генный продукт – ядерный фосфопротеин p53, массой 53 kDa, вовлеченный в регулирование транскрипции и роста клетки [213].

Мутации гена *TP53* являются наиболее часто обнаруживаемой генетической аномалией в опухолях человека [36, 89, 121, 125, 150, 152]. Они вызывают конформационные изменения белка, повышая его стабилизацию, что в свою очередь приводит к повышенному накоплению белка p53 в клетках. Поэтому, иммуногистохимически, ядерная гиперэкспрессия p53 коррелирует с мутациями в этом гене.

Однако в некоторых случаях экспрессия p53 наблюдается при отсутствии обнаруживаемых мутаций [152, 201]. Более низкие уровни иммунореактивности могут быть результатом стабилизации дикого типа p53 другими механизмами. И наоборот, мутации могут произойти без обнаружимого увеличения уровня белка p53 [201].

Мутации *TP53* выявляются при многих раках, в том числе при аденокарциноме легкого, желудка, желчевыводящих путей [125]. Так же они выявляются серозных карциномах яичника (8% - low-grade, 51% - high-grade [65, 75, 153, 204]. Иммуногистохи-

мические исследования демонстрируют отсутствие экспрессии p53 в доброкачественных эндометриоидных кистах и наличие в карциномах яичника [63, 151, 204].

В ряде исследований показано, что гиперэкспрессия p53 при раке яичника была связана с плохой выживаемостью, при наличии мутаций TP53 [79, 151, 204]. В литературе имеются данные о более выраженной экспрессии p53 в пограничных и злокачественных опухолях яичника по сравнению с доброкачественными [94, 109]. По мнению некоторых авторов, более интенсивное окрашивание в пограничных опухолях может быть интерпретировано как озлокачествление опухоли [109]. Несмотря на это, прогностическая роль p53 остается неоднозначной для опухолей яичников [18, 43, 65, 75, 168, 188].

P21 – p53-индуцируемый ген, белковый продукт которого является ингибитором циклин-зависимой киназы, членом семейства Cip/Kip CKIs, способный остановить клеточный цикл в фазе G1, взаимодействуя с комплексом cyclin/cdk [120, 222, 223]. Ингибирующее воздействие p21 на синтез ДНК требует формирования комплекса, состоящего из циклинов, CDKs и PCNA, который, как предполагается, регулируется стехиометрически и образуется только, когда p21 находится в молярном избытке [223]. Если отношение p21 к cdk, меньше чем 1:1, то p21 служит только, как собирающий элемент для образования cdk и не замедляет ее активность. Транскрипцию p21 активизирует p53, путем присоединения как минимум к двум чувствительным участкам промотора гена WAF1 [213].

Исследования, посвященные экспрессии p21 в опухолях яичника неоднозначны [79, 108, 168]. Ouellet с соавт. изучили экспрессию p21 в доброкачественных, пограничных опухолях и

серозном раке [108]. В этом исследовании в серозных карциномах они выявили более слабую реакцию с p21, чем в доброкачественных и пограничных опухолях. Согласно полученным результатам, они предположили, что более слабая экспрессия p21 могла быть признаком агрессивного потенциала опухоли или плохим прогностическим параметром [108].

Однако в другом исследовании экспрессия p21 была ниже в доброкачественных опухолях, чем в пограничных и злокачественных опухолях [79]. Fauvet с соавт. обнаружили, что в пограничных опухолях экспрессия p21 выше, чем в доброкачественных опухолях [94]. Аналогичные результаты получены в исследовании Vassilopoulos, в котором уровень p21 был значительно более высоким в пограничных опухолях яичника, а слабая экспрессия p21 была связана с повышенной агрессивностью опухоли [85].

В исследовании Ozer более интенсивная экспрессия p21 была выявлена в пограничных и злокачественных опухолях яичника, по сравнению с доброкачественными. Однако, не было значимого различия в экспрессии между пограничными и злокачественными формами. При этом общий уровень p21 в серозных опухолях был более высоким, чем муцинозных [109]. Таким образом, было сделано предположение об особой роли p21 в развитии серозных яичниковых опухолей.

В качестве прогностических критериев так же может быть использована экспрессия белков, непосредственно участвующих в регуляции апоптоза (bcl-2, BAX, сурвивин) [12, 13, 14, 15, 29].

Семейство протеинов bcl является наиболее изученными факторами, вовлеченными в регуляцию апоптоза [137, 169, 194]. Это семейство включает более двух десятков членов, в том числе bcl-2, bcl-6, bcl-x, BAX, BAK и некоторые другие [126]. Среди

них выделяют ингибиторы (bcl-2, bcl-x) и индукторы (BAX) апоптоза.

Молекулы, обладающие свойствами ингибировать апоптоз, (bcl-2 , bcl-x) локализуются на мембранах митохондрий, а протеин BAX, являющийся индуктором апоптоза, в норме локализуется в цитоплазме.

Bcl-2 (B-cell leukemia/lymphoma 2 gene) – митохондриальный мембранный белок массой 25 kDa , который блокирует апоптоз, таким образом продлевая жизнь клетки. Ген, кодирующий этот белок, расположен на 18 хромосоме. Приблизительно 75% фолликулярных лимфом имеют транслокацию t (14; 18), которая приводит к гиперэкспрессии этого белка [64, 138, 198, 208].

Bcl-2 обычно экспрессируется в малых лимфоцитах мантийной и маргинальной зон, а так же большинством Т-клеток [41, 95]. Так же bcl-2 может экспрессироваться в ряде опухолей, например карциноме молочной железы и желудка [42, 117]. Для разных карцином показана его различная прогностическая ценность. Изменение соотношения продукции протеинов bcl-2/BAX влияет на баланс популяции пролиферирующих и гибнущих клеток.

Применительно к патологии яичников, изучением этого маркера занимался J.M. Piek (2003), который выявил более высокую экспрессию bcl-2 в эпителии кист-включений в яичниках у женщин, которым была произведена профилактическая овариоэктомия в связи с наследственной предрасположенностью к развитию рака яичников [93]. Chan WY сообщает о более выраженной экспрессии bcl-2 в доброкачественных и пограничных опухолях яичника, по сравнению со злокачественными [43].

Fauvet с соавт. выявили, что в пограничных опухолях экспрессия bcl-2 интенсивнее, чем в доброкачественных и злокачественных опухолях [94]. В исследовании Ozer не было найдено различий, достигающих статистической значимости по экспрессии bcl-2 в доброкачественных, пограничных, и злокачественных опухолях [109].

Вах – проапоптотический протеин, локализующийся в цитоплазме и выступающий как ингибитор роста опухоли [94]. Fauvet с соавт. сообщают об отсутствии статистически значимых различий в экспрессии Вах в доброкачественных, пограничных, и злокачественных опухолях яичника [94]. Schuyer с соавт. утверждают, что слабая экспрессия Вах может быть плохим прогностическим фактором [168]. В исследовании Tai YT найдена корреляция между высоким уровнем Вах и благоприятным клиническим прогнозом [38]. В исследовании Ozer выявлена более высокая экспрессия Вах в пограничных и злокачественных опухолях яичника по сравнению с доброкачественными [109].

Сурвивин - член семейства белков-ингибиторов апоптоза (IAP), избирательно выраженный в огромном количестве опухолей [15]. Сложный функциональный механизм и регулирующие роли сурвивина в делении и смерти клетки препятствовали расшифровке его диагностического, прогностического, и терапевтического значения в области онкологии [111]. Его гиперэкспрессия была выявлена при раке мочевого пузыря, молочной железы, простаты, легкого, желудка, кишки, пищевода, остеосаркоме, различных лимфомах [15]. Для многих опухолей его высокая активность была связана с плохим прогнозом и худшей выживаемостью [15, 192]. В исследовании Tringler et al. была

предпринята попытка иммуногистохимически определить локализацию сурвивина в серозных опухолях яичника. В результате было обнаружено, что экспрессия сурвивина более выражена в доброкачественных и пограничных серозных опухолях, и что наиболее часто в этих опухолях сурвивин локализуется в ядре [107].

Таким образом, данные об экспрессии апоптотических белков в опухолях яичников противоречивы и требуется дальнейшее изучение прогностической значимости этих показателей.

Важное значение, по нашему мнению, имеет изучение мутаций гена бета-катенина (CTNNB1), играющего ключевую роль в особом сигнальном Wnt пути трансдукции, который регулирует пролиферацию клетки и их дифференцировку [217, 219].

Бета-катенин это белок массой 88 kD, член семейства катениновых белков, которые являются важными элементами цитоскелета.

В клетках существуют, по крайней мере, два различных пула В-катенина:

1) связанный с плазматической мембраной комплекс В-катенин – Е-кадгерин, играющий значимую роль в адгезивных свойствах клеток

2) пул В-катенина задействованный в сигнальном Wnt пути как активатор транскрипции. Wnts - секретируемые гликопротеиды имеющие важную роль в регуляции пролиферации и дифференцировки клеток во время развития и в различных тканях [174, 217].

Последний пул регулируется мультипротеиновым комплексом, состоящим из опухолевого супрессора APC, аксина и гликогенсинтетазы [156].

Мутантный ген *CTNNB1* (расположенный на хромосоме

3p21) может привести к накоплению белка бета-катенина в цитоплазме и ядре. В ядре бета-катенин активизирует TCF (T cell factor), регулирующий транскрипцию, тем самым, запуская пролиферацию клеток. Таким образом, нормальные клетки при иммуногистохимической реакции с бета-катенином имеют мембранное окрашивание, в то время как цитоплазматическое и/или ядерное окрашивание является патологическим [52, 216].

Бета-катенин может экспрессироваться как в нормальном поверхностном эпителии яичников, так и в агрессивных яичниковых опухолях [174]. В литературе имеются данные о том, что мутации гена бета-катенина более характерны именно для эндометриоидных подтипов опухолей яичника. Так же указано, что экспрессия бета-катенина становится более интенсивной, начиная от нормального эпителия кист-включений, к цистаденомам и пограничным опухолям, достигая наибольшей выраженности в карциномах яичника. [174]. В исследовании Bracke показана связь экспрессии В-катенина с инвазивным потенциалом и метастазами опухоли. Так, в группе больных с метастазами уровень экспрессии бета-катенина был ниже, чем в группе больных без метастазов [52]. Таким образом, по мнению авторов, снижение экспрессии бета-катенина может быть полезным в определении метастатического потенциала опухоли.

Помимо факторов, влияющих на апоптоз и пролиферацию клеток, возможную прогностическую значимость могут иметь некоторые металлопротеиназы – ферменты из группы протеаз, участвующие в ремоделировании внеклеточного матрикса (ВКМ) и определяющие инвазивный и метастатический потенциал опухолевых клеток.

В норме разрушить экстрацеллюлярный матрикс сложно, но при определенных патологических состояниях, таких как воспа-

ление или неопластическая трансформация, отдельные участки базальной мембраны становятся проницаемыми. Разрушение экстрацеллюлярного матрикса и компонентов базальной мембраны протеазами, в том числе и металлопротеиназами облегчает отщепление опухолевых клеток, пересечение ими тканевых границ, а так же инвазию в подлежащие ткани [5, 15, 188].

Основным компонентом базальной мембраны является коллаген IV типа, к которому, как к основному каркасу прикрепляются ламинин, протеогликаны и другие компоненты [221]. Матриксные металлопротеиназы объединены в большое семейство цинксодержащих внеклеточных протеаз, которые связаны с клеточной мембраной и способны разрушить экстрацеллюлярный матрикс [17,97,144,195]. Разрушение и увеличение проницаемости внеклеточного матрикса происходит путем расщепления его компонентов – коллагена, протеогликанов, эластина, ламинина, фибронектина. Миграция клеток сквозь экстрацеллюлярный матрикс является важным биологическим процессом и встречается как при регенерации тканей, так и при опухолевой инвазии. Для того чтобы преодолеть этот барьер, клетки продуцируют на своей поверхности эндопротеазы (в частности металлопротеиназы) в процессе миграции и разрушают компоненты внеклеточного матрикса.

В семейство матриксных металлопротеиназ входят следующие группы ферментов:

- Специфические коллагеназы (ММР-1, ММР-8);
- Желатиназы (ММР-2, ММР-9);
- Стромелиназы (ММР-3, ММР-10, ММР-11);
- Металлопротеиназы мембранного типа (ММР-14, ММР-15, ММР-16).

Металлопротеиназы играют важную роль в формировании

ВКМ, обеспечивая его проницаемость, как в норме, так и при патологии, например при инвазии и метастазировании злокачественных опухолей [26].

Матриксные металлопротеиназы секретируются в виде неактивных проэнзимов, которые путем протеолитического расщепления трансформируются в активные формы; каждый из членов семейства матриксных металлопротеиназ способен разрушить хотя бы один из компонентов ВКМ [116].

Металлопротеиназы MMP-1 (межтканевая металлопротеиназа массой 52 kDa), MMP-2 (желатиназа А массой 72 kDa) и MMP-9 (желатиназа В, массой 92 kDa) связаны со злокачественным фенотипом опухолевых клеток из-за их уникальной способности разрушать коллаген IV типа, который является главным компонентом базальной мембраны [56,116,124].

Скорость выделения металлопротеиназ увеличивается в пролиферирующих и опухолевых клетках, особенно локализованных в зоне инвазии опухоли, где они выделяются непрерывно и в большом количестве. Они воздействуют на микроокружение опухоли, способствуя разрушению экстрацеллюлярного матрикса, инвазии и формированию метастазов [102].

MMP-1, MMP-2 и MMP-9 в большом количестве продуцируются клетками злокачественных опухолей разных типов, что обеспечивает способность опухоли к инвазии и метастазированию [5, 26, 28, 56].

Для опухолей яичника является характерным усиление разрушения мягких тканей и коллагенового каркаса [193, 210].

Имеются данные о том, что MMP-1 связана с инвазией и миграцией клеток рака яичника [59, 105, 144].

Одним из первых наблюдений, которые предположили роль MMP-9 в инвазии опухоли, имеет отношение к тому факту, что

высвобождение MMP-9 связано с метастатическим фенотипом трансформированных клеток крысиных эмбрионов [139]. В литературе есть указания на наличие высокого уровня MMP-9 у пациентов с серозными формами рака яичников [90]. При исследовании MMP-2 и MMP-9 в раке яичника, их секреция наблюдалась на нескольких линиях клеток рака яичников и была обнаружена в асцитической жидкости пациентов на поздних стадиях. При этом инвазивность опухолевых клеток коррелировала с экспрессией MMP-2 и MMP-9 *in vitro* [59, 123, 160, 179]. Naylor с соавт. так же сообщили о повышении уровня MMP-9 в раке яичников [86]. Однако результаты исследования этих маркеров до сих пор противоречивы: так, имеются данные о связи положительной реакции MMP-2 с плохой выживаемостью; в некоторых исследованиях экспрессия MMP-2 не оказала прогностического влияния на выживание, а в исследовании Sillanpää экспрессия MMP-2 в опухолевых клетках является индикатором благоприятного прогноза при раке яичников [31, 96, 164, 205]. В исследовании Schmalfeldt микроинвазивные клетки пограничных опухолей, разрушающие базальную мембрану, были сильно положительными для MMP-2. MMP-9 не экспрессировался в цистаденомах, тогда как умеренное цитоплазматическое окрашивание опухолевых клеток наблюдалось в пограничных опухолях [110]. В исследовании Sillanpää было показано, что наличие экспрессии MMP-9 в эпителии опухоли является индикатором низкой агрессивности, а экспрессия в окружающей строме – предиктором прогрессии опухоли [164]. Таким образом, предположена двойственная роль MMP-9 в прогрессии опухоли.

Четыре члена семейства тканевых ингибиторов металлопротеиназ (TIMP), как считается, играют многофункциональную роль в прогрессии рака [26, 206]. Во многих исследованиях экс-

прессия TIMP-1 была ассоциирована с плохим прогнозом и агрессивным течением [122, 167]. А в исследовании Rauvala M. высокая серологическая концентрация TIMP-1 коррелировала с неблагоприятным прогнозом, продвинутой стадией болезни, слабым ответом на химиотерапию, более короткими безрецидивными промежутками и снижением выживаемости [167]. Однако роль TIMP изучена совсем мало. На наш взгляд, необходимо комплексное изучение взаимодействия ММР и их ингибиторов. Нельзя не учитывать также роль индукторов, которые могут побудить стромальные фибробласты синтезировать металлопротеиназы.

Таким образом, матриксным металлопротеиназам принадлежит важная роль в стимуляции инвазивных свойств опухоли, что может иметь важное прогностическое значение при пограничных опухолях яичников [105, 166].

Помимо исследования экспрессии белков, участвующих в канцерогенезе, большое внимание уделяется изучению мутаций генов *BRAF*, *KRAS*, *PTEN*, так как они встречаются в различных типах эпителиальных опухолей яичника [39, 57, 87, 88, 91, 118, 119, 130, 153, 188, 212].

Одним из ключевых регуляторных путей клеток является киназный каскад, включающий в себя RAS, RAF, MEK-киназу, ERK-киназу, и MAPK является путем передачи сигналов роста извне в ядро клетки [155].

RAS — это семейство генов, а также белки, которые они кодируют. Суперсемейство белков Ras представляет собой, так называемые малые G-белки, или малые ГТФ-азы и включает в себя Ras, Rho, Arf, G-белок Rab и Ran. Ras являются мембраносвязанными белками, участвующими в передаче сигналов внутрь

клетки. Они функционируют как компоненты Ras-RAF-МАРК сигнального пути трансдукции, который регулирует дифференцировку клеток и пролиферацию внеклеточными стимулами. Некоторые мутации могут приводить к постоянной активации Ras, что нарушает регуляцию деления клеток. Ошибки в регуляции Ras могут привести к росту опухоли и метастазированию [98]. Действительно, в 20—25% опухолей человека обнаружены мутации в гене Ras, повышающие его активность, а в некоторых типах опухолей эта цифра доходит до 90% [82].

KRAS — протоонкоген, представитель семейства белков Ras. Белок KRAS представляет собой ГТФазу и является компонентом многих путей передачи сигнала. KRAS имеет изопрениловую группу на С-конце и обычно связан с клеточными мембранами.

KRAS действует как «молекулярный переключатель», после включения он активирует белки, необходимые для распространения сигналов факторов роста. KRAS связывает ГТФ в активном состоянии и может превращать его в ГДФ. После превращения ГТФ в ГДФ, белок KRAS «выключается». Скорость превращения обычно низкая, но может значительно повышаться при действии вспомогательных белков, усиливающих ГТФазную активность, например, RasGAP. KRAS в свою очередь может связываться с белками GEF, например, SOS1, которые облегчают освобождение связанных нуклеотидов. Соответственно, KRAS без нуклеотида легко связывает новые молекулы ГТФ или ГДФ из цитозоля. Ввиду того, что концентрация ГТФ в цитозоле значительно выше, чем ГДФ, это обычно приводит к активации KRAS.

Другие представители семейства белков Ras: HRAS, RRAS

и NRAS. Эти белки подвергаются регуляции подобным образом, но работают в разных местах клетки.

BRAF является протоонкогеном, кодирующим белок B-Raf [55, 143].

Протеин B-Raf является членом семейства Raf- киназ (серин / треонин-специфичных протеинкиназ). Этот белок играет важную роль в регуляции MAP kinase/ ERKs сигнального пути, который влияет на пролиферацию и дифференцировку клеток. **BRAF** был обнаружен при изучении активирующих мутаций **KRAS** в одном из медиаторов нисходящего потока. В 2002 году были обнаружены мутации этого гена в опухолях человека [143]. Спорадические мутации в этом гене были обнаружены во многих опухолях, в том числе в неходжкинской лимфоме, раке прямой кишки, меланоме, папиллярной карциноме щитовидной железы, аденокарциноме легких [53, 54, 66, 101, 114, 128, 162].

Все известные мутации **BRAF** встречаются в пределах киназного домена. Singer с соавт. определил роль мутаций в **BRAF** и **KRAS** в серозных опухолях яичника; были проанализированы три наиболее частые мутации (в кодоне 599 гена **BRAF** и кодоны 12 и 13 гена **KRAS**). Ни одна из СПО не содержала одновременно мутацию и в **BRAF** и **KRAS** генах. Мутации **BRAF** обнаруживались при прогрессии серозных пограничных опухолей [141]. Агрессивные high-grade серозные карциномы не содержали ни **BRAF**, ни одной из двух **KRAS** мутаций. При этом мутации **TP53** в этих опухолях были обнаружены приблизительно в 60 % случаев [65, 82].

Анализ данных литературы позволяет прийти к заключению о том, что высокий удельный вес женщин репродуктивного возраста в структуре заболеваемости пограничными опухолями

яичника диктует необходимость поиска новых клинимо-морфологических и молекулярно-биологических факторов прогноза. В литературе имеется много работ посвященных диагностике, морфологии и лечению ПОЯ, но особенности биологического поведения пограничных опухолей яичника изучены недостаточно. До сих пор не выработана единая теория происхождения и развития ПОЯ. В диагностике и лечении ПОЯ остается ряд неразрешенных вопросов.

Необходимо отметить, что практически отсутствуют данные о наличии тех или иных молекулярно-биологических факторов, достоверно влияющих на развитие рецидивов. На наш взгляд, недостаточно четко описаны критерии дифференциальной диагностики ПОЯ с высокодифференцированной карциномой. Весьма противоречивы данные иммуногистохимических исследований этих новообразований, особенно касающиеся изучения маркеров апоптоза и пролиферативной активности. Нет единого мнения относительно прогностической значимости микропапиллярных структур и микроинвазии. Не выявлены клинимо-морфологические факторы, влияющие на течение заболевания. Расширение возможностей изучения данной патологии с помощью иммуногистохимических и молекулярно-генетических методов позволит по-новому взглянуть на патологические процессы, происходящие в опухоли, чтобы в дальнейшем обеспечить адекватную дифференциальную диагностику и возможность прогнозирования развития рецидивов при проведении органосохраняющих операций.

Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материал исследования

Материалом для исследования послужили парафиновые блоки от 122 пациенток, проходивших лечение или консультированных в МНИОИ им. П.А. Герцена и Рязанском областном клиническом онкологическом диспансере с 2006 по 2012 год. Клинические данные анализировались по амбулаторным картам и историям болезни. Средний возраст пациенток составил 34,5 лет (от 18 до 74 лет).

Исследование включало 101 пограничную опухоль яичника, из которых 79 (78,2%) опухолей были представлены серозным подтипом, 14 (13,8%) – муцинозным, 5 (5%) опухолей оказались смешанными, (серозно-муцинозными) и 3 (3%) эндометриоидными. Такие редкие формы пограничных опухолей как переходноклеточные и светлоклеточные не встречались.

В качестве группы сравнения был отобран 21 случай высокодифференцированной серозной аденокарциномы яичника на фоне серозной пограничной опухоли.

Стадия (pT) определялась в соответствии с рекомендациями Международного противоракового союза (TMN, UICC, FIGO) [TNM]:

T1 (I): опухоль в пределах одного или обоих яичников;

T2 (II): опухоль поражает один или оба яичника и распространяется на структуры малого таза;

T3 (III): опухоль распространяется на один либо оба яичника с подтвержденными при микроскопическом исследовании метастазами в брюшине за пределы малого таза;

M1 (IV): отдаленные метастазы.

При ПОЯ опухоли I стадии (pT1) были представлены в 74

(73,3%) наблюдениях, II стадии (pT2) – в 16 (15,8%) наблюдениях, III стадия (pT3) составила 11 (10,9%) наблюдений. Опухоли IV стадии отсутствовали (табл. 2.1).

Таблица 2.1

Распределение ПОЯ по стадиям

Стадия			
I	II	III	IV
74 (73,3%)	16 (15,8%)	11 (10,9%)	0
Всего: 101			

Одностороннее поражение яичников отмечено в 62 (61,4%) наблюдениях, билатеральное – в 39 (38,6%).

Импланты выявлены 27 (26,7%) случаях. При этом, в 25 (92,6%) случаях обнаружены неинвазивные подтипы, а в 2 (7,4%) – инвазивные.

Пациентки были разделены на две группы:

1 группа – больные с отсутствием рецидивов ПОЯ (83 человека – 82,2%);

2 группа – больные с наличием рецидива ПОЯ (18 человек – 17,8%).

В 1 группе распределение по стадиям было следующим: 70 случаев (84,3%) – pT1, 5 (6%) – pT2, 8 (9,7%) – pT3 (табл. 2.2).

Таблица 2.2

Распределение ПОЯ 1 группы по стадиям

Стадия			
I	II	III	IV
70 (84,3%)	5 (6%)	8 (9,7%)	0
Всего: 83			

Импланты обнаружены в 14,5% (12) случаях. Одностороннее поражение отмечено у 63,9% (53) пациенток, двухстороннее – у 36,1% (30).

2 группа включала 4 опухоли pT1, 11 – pT2, 3 – pT3 (табл. 2.3).

Таблица 2.3

Распределение ПОЯ 2 группы по стадиям

Стадия			
I	II	III	IV
4 (22,2%)	11 (61,1%)	3 (16,7%)	0
Всего: 18			

Одностороннее и двухстороннее поражение диагностировано в 50% случаев соответственно. Импланты обнаружены у 77,8% (14) пациенток.

В группе аденокарцином распределение больных по стадиям было следующим: pT1 – 6 случаев, pT2 – 1 случай, pT3 – 14 случаев (табл. 2.4).

Таблица 2.4

Распределение больных аденокарциномой по стадиям

Стадия			
I	II	III	IV
6 (28,6%)	1 (4,8%)	14 (66,6%)	0
Всего: 21			

Весь материал фиксировался в 10% забуференном формалине в течение 24 часов, обрабатывался по стандартной методике с использованием ксилола, заливался в парафин. С блоков изго-

тавливались срезы толщиной 4 мкм, окрашивались гематоксилином и эозином.

Иммуногистохимическое исследование

Для иммуногистохимического исследования были изготовлены срезы толщиной 4 мкм, которые наносили на высокоадгезивные стекла и высушивали при температуре 37⁰С в течение 18 часов.

Восстановление антигенной активности проводили в модуле предобработки для автостейнера при температуре 97⁰С в течение 25 мин. и последующим остыванием до 65⁰С в течение 20 мин в цитратном буфере рН 6,0 или в трис-ЭДТА буфере рН 9,0.

В качестве детекционной системы применяли систему «En-Vision Flex» («Dako»), в качестве хромогена – диаминобензидин. Для получения результатов пригодных для количественной обработки реакции проводили с помощью автоматического иммуногистостейнера «Avtosteiner Dako Link 48».

Для исследования были использованы коммерческие моноклональные антитела к маркерам пролиферативной активности (Ki67, циклин D1), апоптоза (Bcl2, Bax), супрессорам опухолевого роста (p53, p21), матриксным металлопротеиназам (ММР-1, ММР-2, ММР-9), их тканевым ингибиторам (TIMP-1, TIMP-2), а так же к бета-катенину (компоненту цитоскелета и сигнального wnt-пути). Антитела к сурвивину были предоставлены разработчиками (ИБХ РАН).

Характеристика антител и условия проведения реакций (метод восстановления антигенной активности и использованные разведения антител) представлены в таблице 2.5.

Таблица 2.5**Характеристика используемых антител**

Наименование	Фирма производитель	Разведение	Условия демаскировки
Ki-67(MIB.1) мо- ноклональные	Dako	1:40	97°C, pH 6.0
P53(DO7) моно- клональные	Dako	1:70	97°C, pH 9.0
Bcl2 монокло- нальные	Dako	1:40	97°C, pH 9.0
В-катенин моно- клональные	Dako	1:200	97°,pH 9.0
P21 моноклональные	Dako	1:70	97°,pH 9.0
Bax моноклональные	Dako	1:70	97°,pH 6.0
Сурвивин моноклональные	ИБХ РАН	1:150	97°,pH 6.0
Циклин D1 мо- ноклональные	Dako	1:50	97°,pH 9.0
MMP1 монокло- нальные	TermoFisher	1:50	97°,pH 6.0
MMP2 монокло- нальные	TermoFisher	1:100	97°,pH 6.0
MMP9 монокло- нальные	Dako	1:70	97°,pH 9.0
TIMP1 монокло- нальные	Dako	1:50	97°, pH9.0
TIMP2 монокло- нальные	TermoFisher	1:50	97°, pH9.0

Интенсивность реакций, локализованных в цитоплазме (ММР2, ММР9, ТИМР1, ТИМР2) и на мембранах клеток (бета-катенин) оценивали полуколичественным способом по балльной шкале от 0 до 3:

0 – отсутствие реакции

1 – слабая реакция

2 – умеренная реакция

3 – сильная реакция

Оценку экспрессии bcl2, BAX, Ki67, p21, циклина D1 и сурвивина производили путем подсчета количества окрашенных клеток на 100 клеток препарата в 3 полях зрения (увеличение x40) и выражали полученные результаты в процентах.

Препараты изучались при помощи светового микроскопа Axioskop «OPTON» со стандартным набором оптики. Микрофотографирование производилось на микроскопе биологическом универсальном Leica DM4000B с цветной цифровой камерой DFC495 при помощи стандартного программного средства Leica Application Suite v. 3.7.0.

Генетическое исследование

В обеих группах проводилось определение наличия мутации p.V600E в 15 экзоне гена *BRAF*. Для исследования были отобраны парафиновые блоки каждого случая, содержащие не менее 70% опухоли.

Выделение ДНК проводили из операционного материала, фиксированного в формалине с последующей парафинизацией, коммерческим набором «ДНК-Сорб» (ИнтерЛабСервис, РФ).

1. Парафиновый блок с образцом ткани нарезали на микро-томе в пробирку объемом 1,5 мл 10 срезов по 5мкм каждого образца.

2. В пробирку, содержащую нарезанный материал, добавляли 1500 мкл ксилола, инкубировали 15-20 мин., периодически встряхивая пробирку на вортексе. Затем центрифугировали при 13,4 тыс. об/мин в течение 1 мин. Аккуратно отбирали супернатант отдельным наконечником для каждой пробирки.

3. В пробирки добавляли по 1500 мкл ксилола и инкубировали в течение 5 мин., периодически встряхивая пробирку на вортексе. Затем центрифугировали при 13,4 тыс. об/мин 1 мин. Аккуратно отбирали супернатант отдельным наконечником для каждой пробирки.

4. В пробирки с осадком добавляли 1500 мкл 96% этанола, встряхивали пробирку на вортексе и центрифугировали 1 мин. при 13,4 тыс. об/мин. Аккуратно отбирали супернатант отдельным наконечником для каждой пробирки.

5. В пробирки с осадком добавляли 500 мл лизирующего буфера (10 mM Tris-HCl, 2 mM ЭДТА, 4 mM NaCl, pH=8,0) и 30 мкл протеиназы К. Встряхивали пробирки на вортексе и инкубировали сутки при 60-65°C.

6. Тщательно ресуспендировали сорбент универсальный на вортексе. В каждую пробирку отдельным наконечником добавляли 25 мкл ресуспендированного сорбента универсального. Тщательно перемешивали на вортексе и инкубировали 15-20 мин., встряхивая пробирки через каждые 2 минуты.

7. Пробирки центрифугировали при 5 тыс. об/мин 1 мин. Аккуратно отбирали супернатант отдельным наконечником для каждой пробирки.

8. Добавляли в пробирки по 300 мл раствора для отмывки №1, перемешивали на вортексе до полного ресуспендирования сорбента. Пробирки центрифугировали при 5 тыс. об/мин в течение 1 минуты. Аккуратно отбирали супернатант отдельным

наконечником для каждой пробирки.

9. В пробирки добавляли по 500 мл раствора для отмывки №2, перемешивали на вортексе до полного ресуспендирования сорбента. Пробирки центрифугировали при 10 тыс. об/мин 1 мин. Аккуратно отбирали супернатант отдельным наконечником для каждой пробирки.

10. Повторяли процедуру отмывки, следуя пункту 9, отбирали супернатант полностью.

11. Помещали пробирки в термостат при температуре 64-65°C на 5-10 минут для подсушивания сорбента. При этом крышки пробирок были открыты.

12. В каждую пробирку добавляли по 25-50 мкл ТЕ-буфера. Перемешивали на вортексе. Помещали в термостат при температуре 64-65°C на 5-10 минут, периодически (1 раз в минуту) встряхивая на вортексе.

13. Центрифугировали пробирки при 12-14 тыс. об/мин 1 мин. Супернатант содержал очищенную ДНК готовую для постановки ПЦР.

Далее в полученном образце ДНК проводилось исследование наличия мутации в гене BRAF.

Анализ мутации гена BRAF выполняли методом ПЦР 15 экзона гена BRAF и последующим секвенированием. ДНК из парафиновых блоков выделяли методом, описанным ранее. Исследование было проведено на образцах 40 опухолей.

ПЦР проводили по следующей схеме: к 0.1 мкг геномной ДНК добавляли 0.05 мкМ каждого олигопраймера, 200 мкМ каждого дезоксинуклеотидтрифосфата, 1-2 ед. Taq-полимеразы, 50 мкл однократного буфера для ПЦР следующего состава: 50 мМ KCl, 10 мМ Трис-HCl (pH 8,4), 5 мМ MgCl₂. Затем добавляли 30 мкл вазелинового масла, прогревали смесь при 95°C в течение 10

мин и проводили 35 цикла по следующей программе: денатурация при 95°C – 30 с, отжиг и элонгация при 60°C – 2 мин 30 с. Использовались праймеры следующей нуклеотидной последовательности:

BRAF15F: cataatgcttgctctgatagga

BRAF15R: ggccaaaaatttaatcagtggga.

Продукты ПЦР разделяли в 6%-ном денатурирующем полиакриламидном геле и окрашивали нитратом серебра. Прямое секвенирование последовательностей экзонов проводили с использованием праймеров, которые применяли для амплификации. Секвенирование проводилось по протоколам ABI Prism 310 Genetic Analyzer Kits (“Applied Biosystems”, США). Компьютерный анализ ДНК проводился с использованием программы Oligo 4.0. и базы данных Blast. Анализ хроматограмм секвенированных последовательностей проводили с помощью программы Chromas.

Статистическая обработка данных

Многофакторный анализ характера экспрессии иммуногистохимических маркеров и выявленных генетических нарушений проводили с помощью программы STATISTICA v.8.0 и MedCalc 12.0 методами критерия Колмогорова-Смирнова, определения квартилей, U-критерия Манна-Уитни, расчета коэффициента корреляции. При сравнении частот мутации гена *BRAF* в разных группах пациентов использовали точный двусторонний критерий Фишера (программа GraphPad InStat v. 3.05.).

Глава 3. АНАЛИЗ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ ПОГРАНИЧНЫХ ОПУХОЛЕЙ ЯИЧНИКОВ

Серозные пограничные опухоли отмечены нами в 78,2% (79) случаев ПОЯ. Гистологически они характеризовались наличием стромальных полиповидных разрастаний, желез, и сложных иерархически ветвящихся сосочков. То есть от более крупного, центрально расположенного сосочка ответвляются все более мелкие сосочки, в которых сохраняется стромальный компонент, и которые заканчиваются гроздьями клеток (рис. 3.1).

Сосочки и железы были выстланы стратифицированным кубическим или столбчатым эпителием, часто с наличием реснитчатых клеток, напоминающих эпителий маточной трубы (рис. 3.1, 3.2). Так же в опухоли иногда встречались большие клетки типа сапожного гвоздя с обильной эозинофильной цитоплазмой и мезотелиально-подобные клетки.

Ядра клеток были равномерными, округлыми, базально-расположенными, с мелкодисперсным хроматином и редкими, едва заметными ядрышками. Выраженность ядерной атипии варьировала от слабой до умеренной степени как в целом, так и в пределах конкретно взятой опухоли. Митозы были редки, патологические их формы не были отмечены в этих опухолях. В пограничных опухолях мы не выявили ни крибриформных структур, ни солидных пластов. Явная стромальная инвазия так же отсутствовала.

Случаи пограничных опухолей с микроинвазией не вошли в настоящее исследование, так как по нашему мнению, а так же мнению ряда авторов фокусы микроинвазии должны быть расценены в качестве мелких очагов инвазивного серозного рака, развивающегося на фоне пограничной опухоли [50, 84].

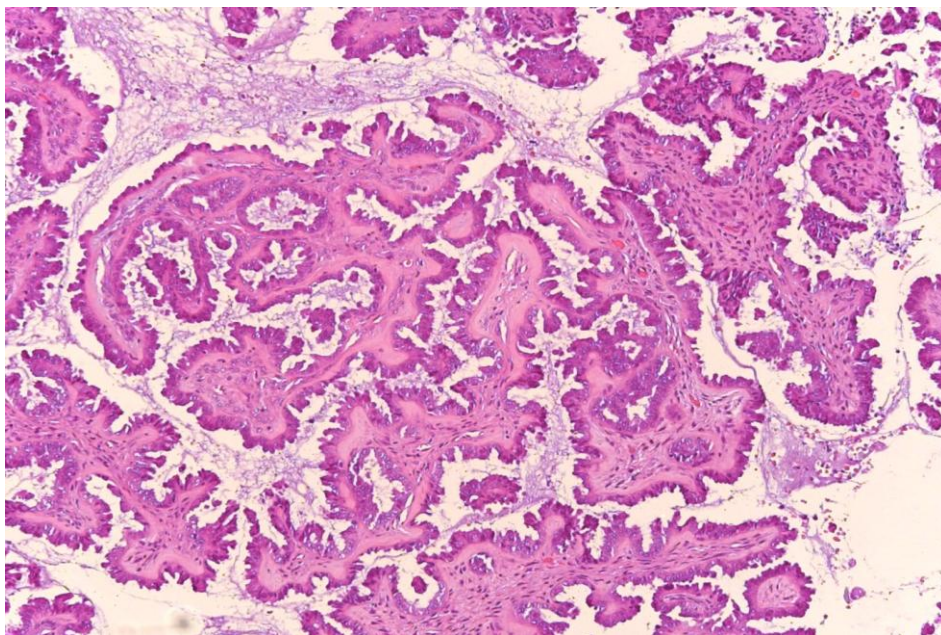


Рис. 3.1. СПО. Иерархически ветвящиеся сосочки, покрытые эпителием, напоминающим эпителий маточной трубы. Гематоксилин и эозин, х100.

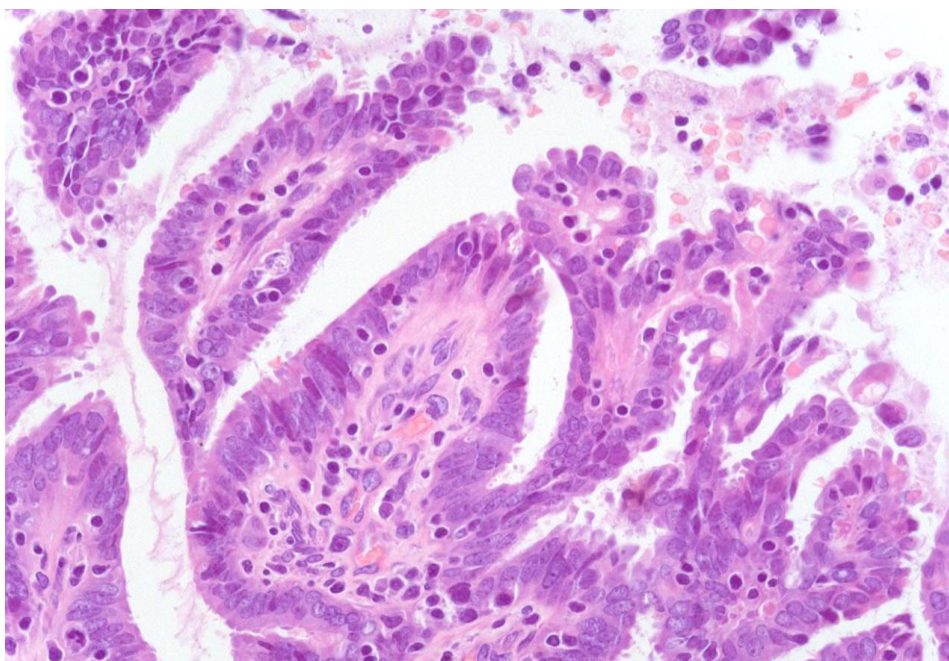


Рис. 3.2. СПО. Эпителий серозного типа. Гематоксилин и эозин, х400.

В 29,7% всех СПО мы выявили так называемые псаммомные тельца (рис. 3.3, 3.4), которые представляют собой мелкие

кальцинаты, располагающиеся как в гнездах эпителиальных клеток, так и в окружающей строме. У пациенток с наличием рецидива они были отмечены в 50% случаев, а у пациенток без рецидивов – в 25,3%.

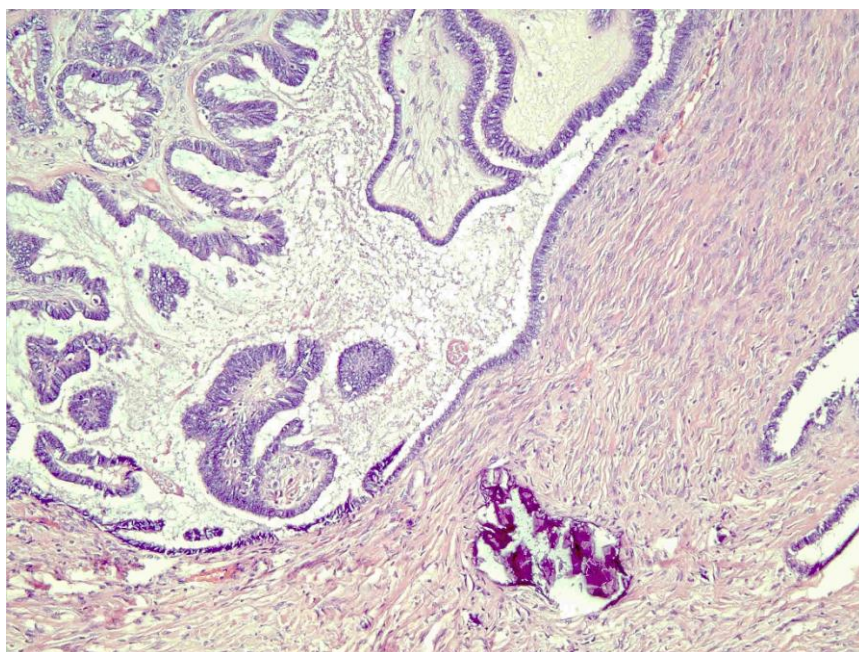


Рис. 3.3. Псаммомные тельца в СПО. Гематоксилин и эозин, x100.

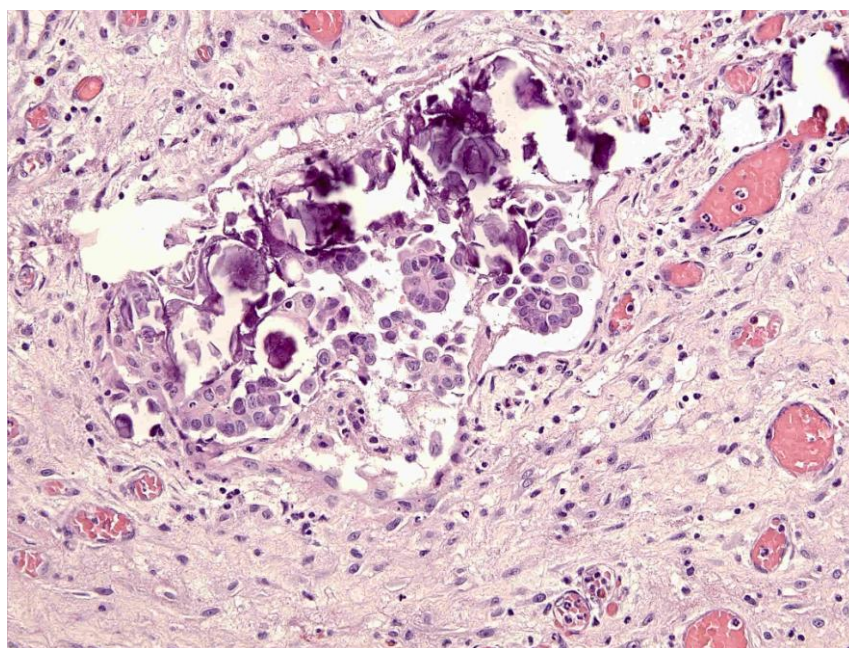


Рис. 3.4. Псаммомные тельца в импланте СПО. Гематоксилин и эозин, x200.

В 7,9% (8) случаев ПОЯ нами были выявлены фокусы микропапиллярной архитектуры на фоне типичной серозной пограничной опухоли.

Гистологически эти очаги представляли собой ажурные структуры очень тонких, хрупких, удлинённых сосочков, растущих неиерархическим способом от фиброзных стеблей и состоящих из стратифицированных нереснитчатых кубических клеток с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением (рис. 3.5).

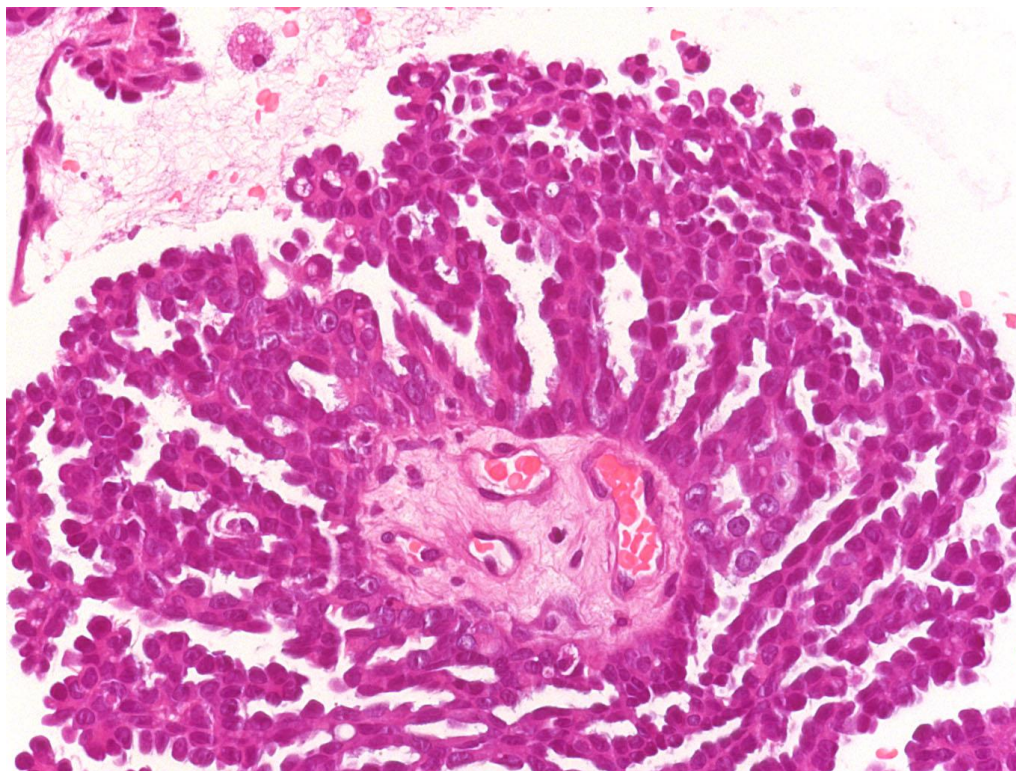


Рис. 3.5. Микрососочковая архитектура в серозной пограничной опухоли. Гематоксилин и эозин, x400.

Ядерная атипия в этих структурах была относительно более выражена, чем в структурах типичной пограничной опухоли, однако высокая степень атипии отсутствовала. Мы не выявили более высокой митотической активности в микрососочковых очагах, по сравнению со структурами типичных СПО. Патологиче-

ские митозы так же не были обнаружены.

Все случаи микрососочковых СПО были выявлены в группе пациенток с наличием рецидива.

В ПОЯ без рецидива микрососочковые структуры не выявлялись.

Так же все эти опухоли содержали области типичной серозной пограничной опухоли, что, вероятно, указывает на этапность их развития.

Перитонеальные импланты были выявлены в 26,7% (27 из 101) случаев и только в серозных ПОЯ, что является их характерной особенностью по сравнению с другими подтипами ПОЯ. Неинвазивные импланты отмечены в 92,6% (25) случаев, инвазивные – в 7,4% (2).

Выявлены неинвазивные импланты СПО двух гистологических подтипов: эпителиальные и десмопластические [47]. Смешанные импланты не обнаружены.

Эпителиальные неинвазивные импланты были представлены небольшими скоплениями пролиферирующих эпителиальных клеток, мелкими сосочковыми структурами со слабой или умеренной ядерной атипией.

Гистологическое строение имплантов было аналогично первичной СПО в яичнике (рис. 3.6).

Импланты обнаруживались на поверхности брюшины или в ее инвагинатах, стромальная реакция отсутствовала или была слабо выражена.

Часто выявлялись псаммомные тела, в некоторых очагах – при отсутствии клеточных элементов. Инвазия окружающих тканей не наблюдалась.

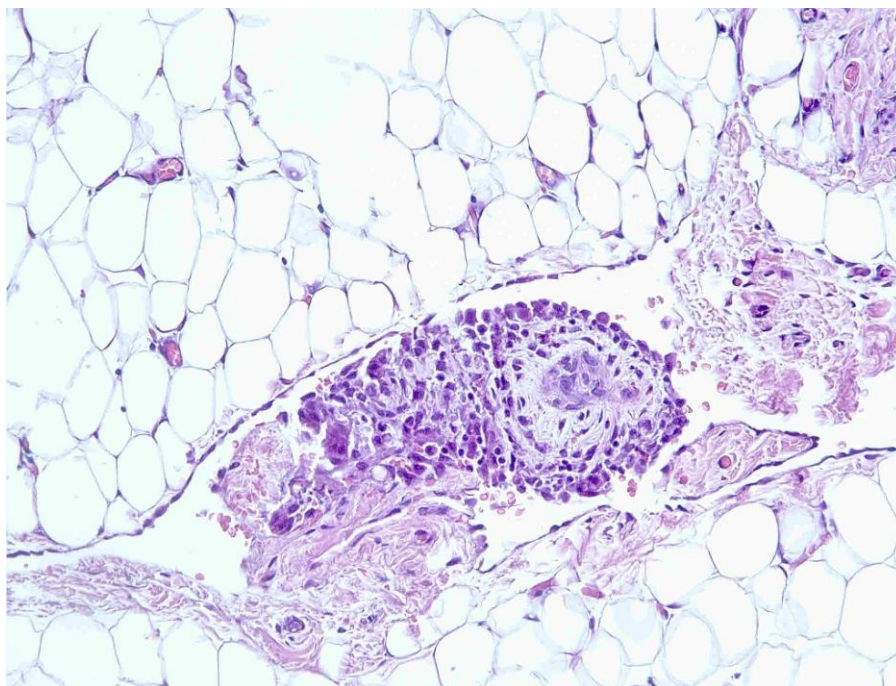


Рис. 3.6. Эпителиальный неинвазивный имплант СПО. Гематоксилин и эозин, x200.

Десмопластический подтип неинвазивных имплантов в характеризовался значительной пролиферацией стромы, напоминающей зрелую грануляционную ткань с незначительным эпителиальным компонентом в виде мелких клеточных гнезд, желези- стых структур или отдельных клеток, «замурованных» в строме (рис. 3.7).

Строма при данном подтипе имплантов количественно пре- восходила эпителиальный компонент. В стромальном компонен- те обнаруживались псаммомные тельца, а так же клетки острого и хронического воспаления. Достоверная инвазия в подлежащую ткань так же отсутствовала.

Отдельные, изолированные в строме, опухолевые клетки не расценивались нами как признак инвазии [48]. Ядерная градация в десмопластических имплантах соответствовала таковой в пер- вичной опухоли.

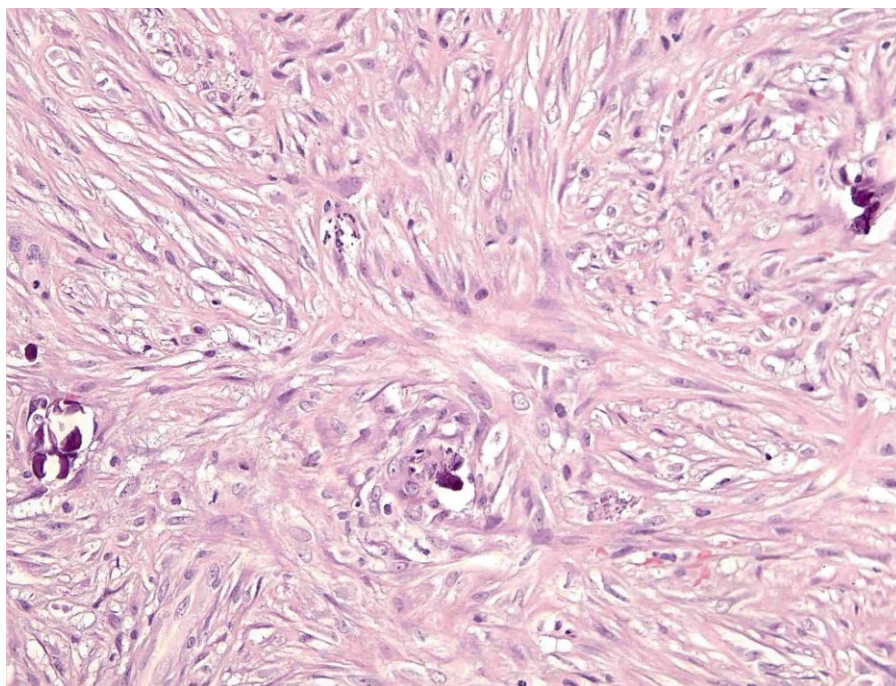


Рис. 3.7. Неинвазивный десмопластический имплант СПО. Единичные скопления опухолевых клеток «замурованы» в стро-
ме. Гематоксилин и эозин, x200.

Инвазивные импланты проявлялись беспорядочной ин-
фильтрацией нормальных тканей, имели нечеткие контуры. Вы-
являлись крупные группы эпителиальных клеток, единичные
микрососочки, с наличием сливных железистых и крибриформ-
ных структур, окруженных щелями (рис. 3.8).

Так же обращало на себя внимание преобладание эпители-
ального компонента над стромой. Клетки были относительно
мономорфными, для них было характерно высокое ядерно-
цитоплазматическое соотношение, умеренная ядерная атипия,
очагами достигающая до выраженной.

В целом, морфологические характеристики инвазивных им-
плантов больше соответствовали высокодифференцированной
(low grade) серозной аденокарциноме, нежели типичной ПОЯ.

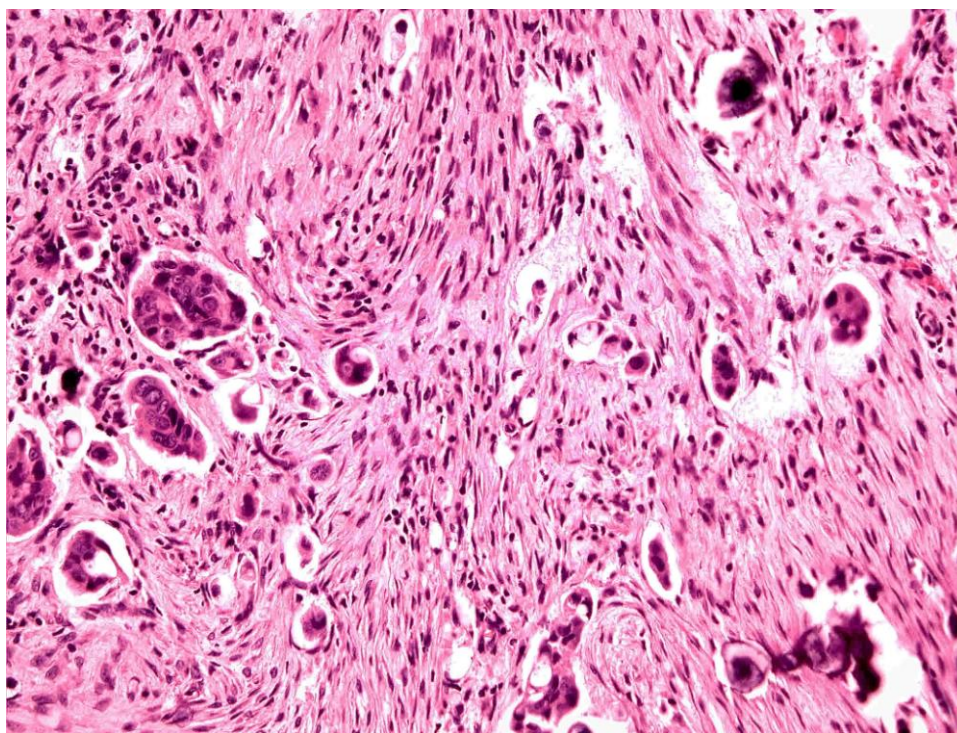


Рис. 3.8. Инвазивный имплант СПО. Беспорядочная инфильтрация нормальных тканей группами эпителиальных клеток, формирующих крибриформные структуры и окруженных щелями. Гематоксилин и эозин, x200.

В группе ПОЯ без рецидивов импланты отмечены в 15,7% (13 из 83) случаев, все они оказались неинвазивными. В группе с рецидивами импланты выявлены в 77,8% (14 из 18) случаев, при этом два (14,3%) из них были инвазивными, остальные (85,7%) – неинвазивными.

В группу сравнения включены случаи высокодифференцированной (low grade) серозной аденокарциномы на фоне серозной ПОЯ. Морфологически, пограничный компонент был представлен как структурами типичной серозной ПОЯ, так и участками микропапиллярной. Аденокарцинома состояла преимущественно из желез, с наличием мелких солидных участков, общая доля которых не превышала 5% (рис. 3.9).

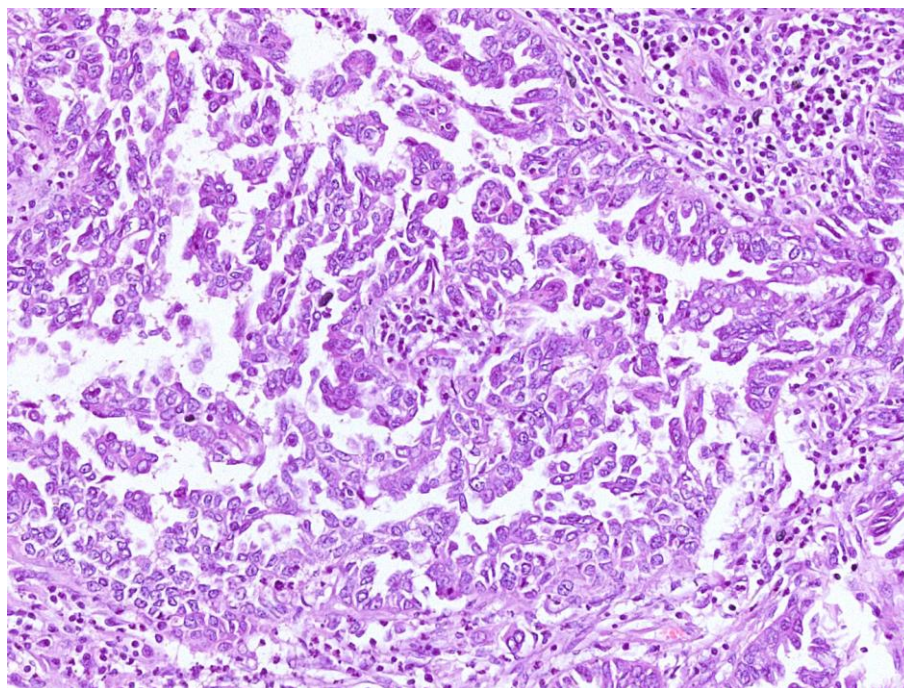


Рис. 3.9. Low grade серозная аденокарцинома. Неправильно ветвящиеся, высококлеточные сосочки с отсутствующей либо минимально выраженной стромальной основой. Гематоксилин и эозин, x200.

Клетки были более крупными, чем в пограничном компоненте, округленными, со скудной цитоплазмой, высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением, чаще с умеренной ядерной атипией, однако встречались и очаги выраженной атипии с гиперхромными, увеличенными и несколько плеоморфными ядрами, которые, даже при отсутствии явной инвазии расценивались как рак (рис. 3.10, 3.11). Ядра клеток были мелкими, относительно однородными, часто, с заметными маленькими ядрышками, митозы редки. Клеточные особенности несколько отличались от таковых при пограничных опухолях, однако общие ядерные характеристики были подобными в обеих группах.

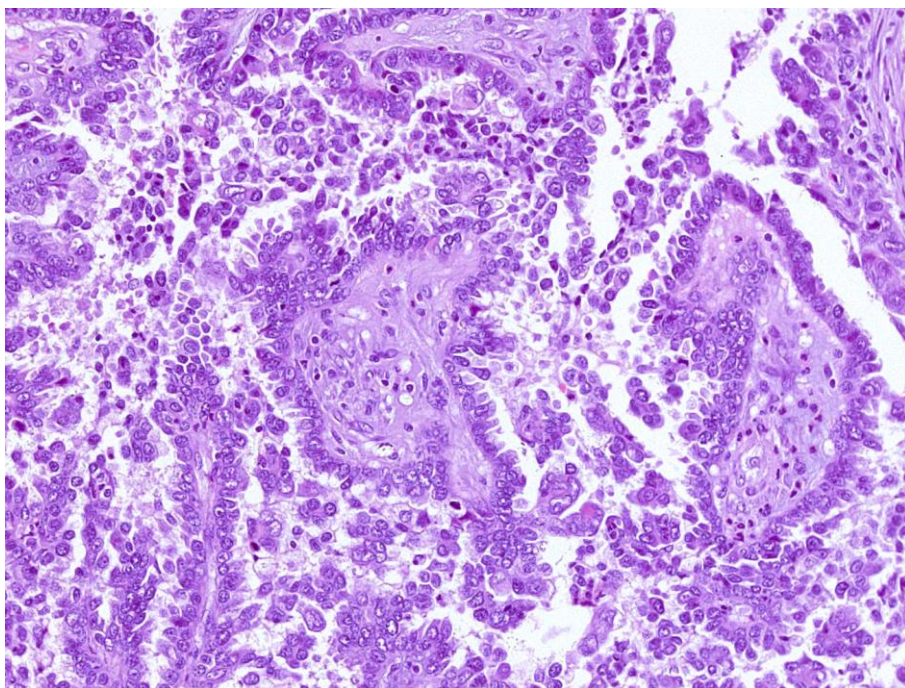


Рис. 3.10. Low grade серозная аденокарцинома. Микрососочковые структуры при умеренной ядерной атипии. Гематоксилин и эозин, x200.

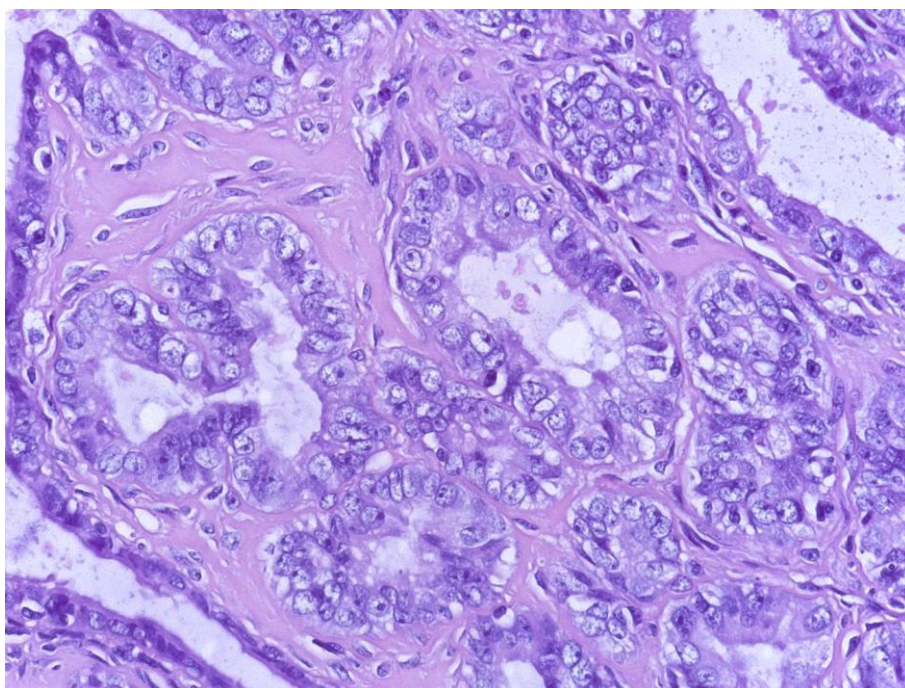


Рис. 3.11. Low grade серозная аденокарцинома. Умеренная ядерная атипия, фокус стромальной инвазии. Гематоксилин и эозин, x400.

Архитектурно злокачественный компонент был построен из маленьких гнезд клеток и неправильно ветвящихся, высококлеточных сосочков с отсутствующей либо минимально выраженной стромальной основой (рис.3.9). Стромальная инвазия характеризовалась беспорядочным расположением мелких солидных гнезд, желез, сосочков или микрососочков в десмопластической строме с образованием крибриформных структур (рис. 3.11). Эти гнезда и железистоподобные структуры часто были окружены щелями. Псаммомные тельца так же были значительно распространены.

Муцинозные пограничные опухоли яичников в нашем исследовании выявлены в 18,8% (19) случаев. В соответствии с классификацией ВОЗ МПО были разделены на эндоцервикальный и интестинальный подтипы.

Эндоцервикальный тип диагностирован в 26,3% (5) случаев.

Опухоли этого типа характеризовались наличием папиллярных структур, архитектурно схожих с сосочками серозных пограничных опухолей. Сосочки были покрыты столбчатыми, богатыми муцином клетками с базально расположенными ядрами, напоминающими клетки эндоцервикса. Верхушки сосочков были покрыты полигональными клетками с обильной эозинофильной цитоплазмой (рис. 3.12). Так же, иногда встречались редкие эндометриоидные и реснитчатые серозные клетки, при отсутствии областей кишечной дифференцировки. Ядра с умеренной атипией, кое-где - тяжелой. Митозы редкие. Микрососочковой архитектуры и деструктивной инвазии стромы не наблюдалось. В опухоли присутствовала лейкоцитарная полиморфноклеточная инфильтрация эпителия, стромы сосочков и внеклеточного внутрипросветного муцина.

Интестинальный тип выявлен в 73,7% (14) случаев.

Микроскопически, муцинозные пограничные опухоли кишечного типа состояли из кист, и желез, выстланных атипичным эпителием желудочно-кишечного типа с наличием бокаловидных клеток (рис. 3.13). Эпителий характеризовался выраженной пролиферацией и стратификацией, наличием трех и более слоев (рис. 3.14), в отличие от доброкачественных муцинозных опухолей, для которых характерна плоская выстилка. Большинство опухолей также содержали фокусы доброкачественного муцинозного эпителия, который напоминал эндоцервикальный или желудочный эпителий. Ядерная атипия была слабой либо умеренной, митотическая активность – низкой. Стромальная инвазия отсутствовала.

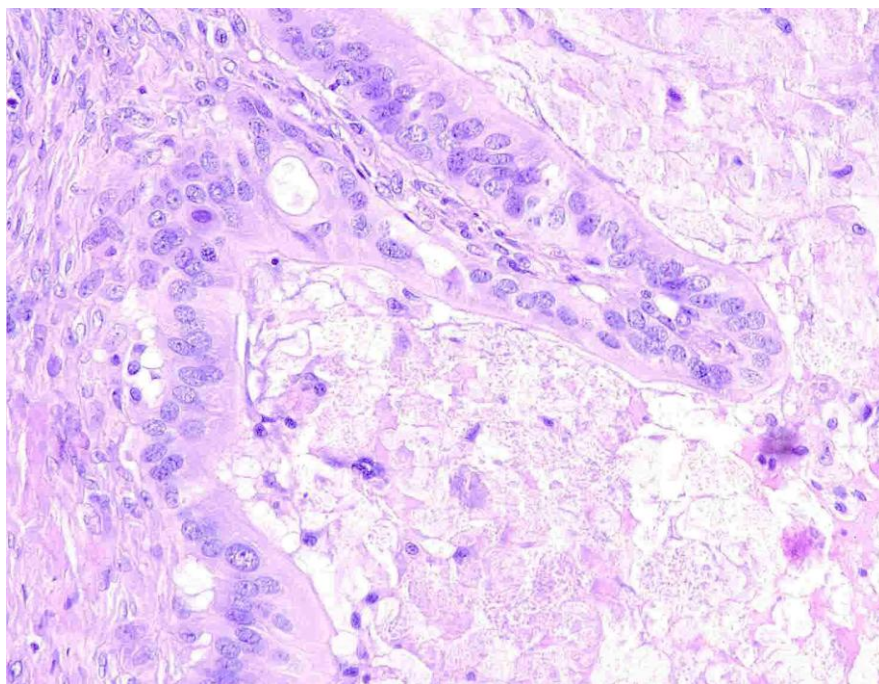


Рис. 3.12. МПО эндоцервикального типа. Сосочек, покрытый, богатыми муцином клетками с эозинофильной цитоплазмой. Гематоксилин и эозин, х400.

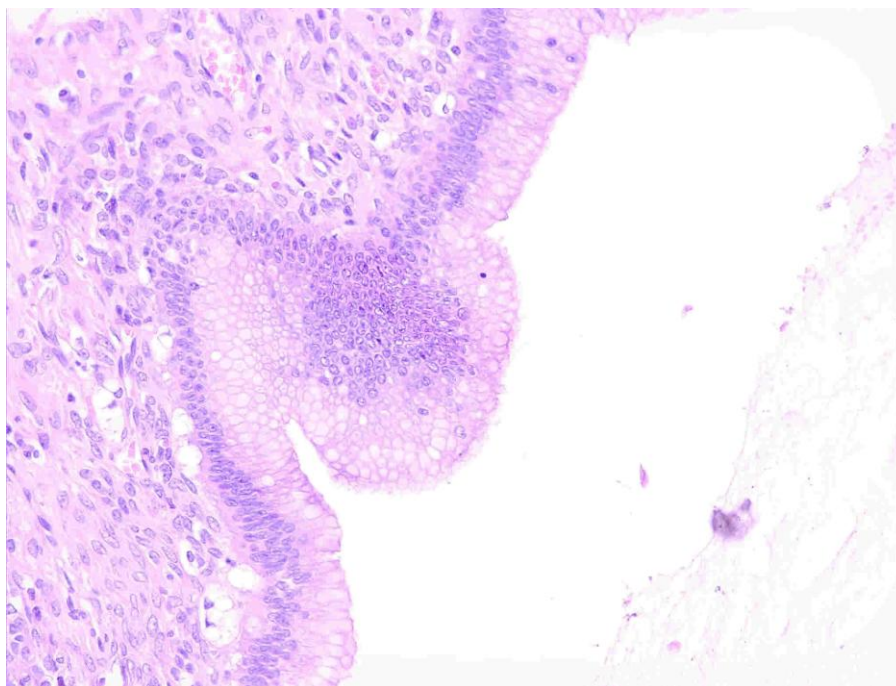


Рис. 3.13. МПО интестинального типа. Выраженная стратификация эпителия. Гематоксилин и эозин, х200.

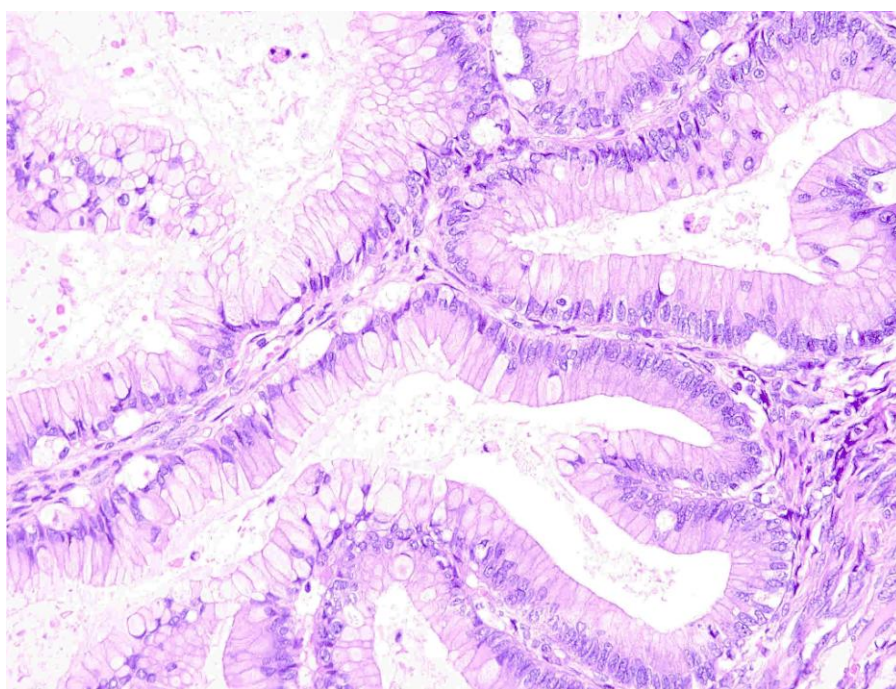


Рис. 3.14. МПО интестинального типа. Железы, выстланные атипичным эпителием желудочно-кишечного типа. Гематоксилин и эозин, х200.

Эндометриоидные пограничные опухоли яичников выявлены лишь в 3% (3) случаев. Эпителий в них был эндометриального типа и напоминал атипическую гиперплазию эндометрия (рис. 3.15).

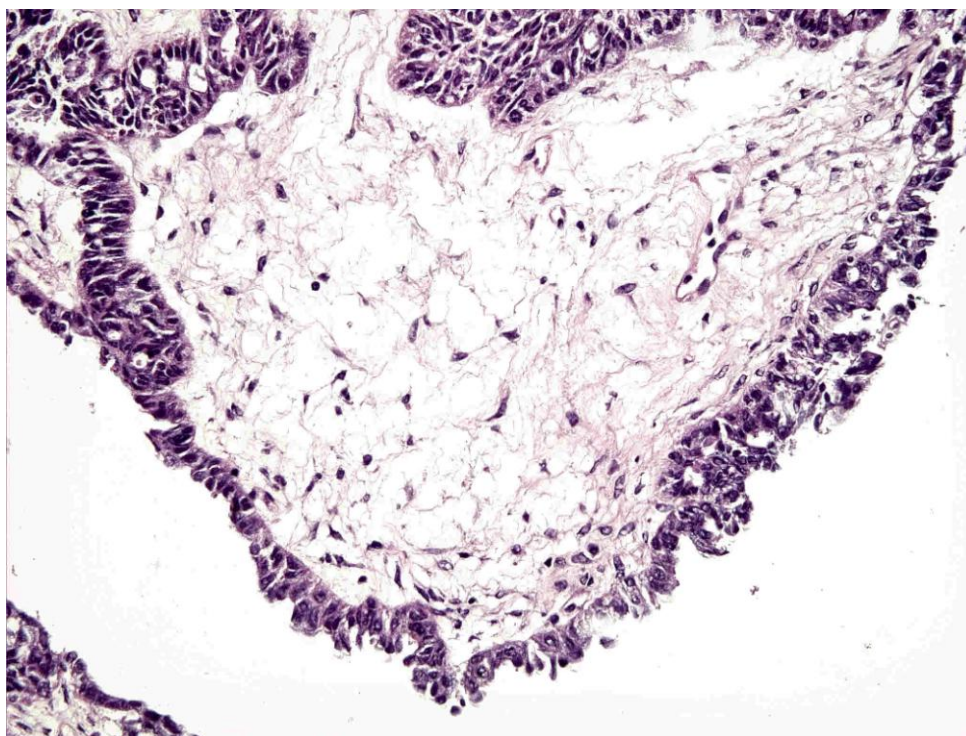


Рис. 3.15. Эндометриоидная пограничная опухоль яичника.
Гематоксилин и эозин, х200.

Глава 4. АНАЛИЗ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ ПОГРАНИЧНЫХ ОПУХОЛЕЙ ЯИЧНИКОВ

Иммуногистохимическое исследование было проведено на образцах 79 серозных ПОЯ, 18 – муцинозных и 3 – эндометриоидных. В качестве группы сравнения была исследована 21 высокодифференцированная серозная аденокарцинома. Изучали маркеры пролиферативной активности (Ki-67, циклин D1), апоптоза (Bcl-2, Вах, сурвивин), супрессоры опухолевого роста (p53, p21), матриксные металлопротеиназы (ММР-1, ММР-2, ММР-9), их тканевые ингибиторы (TIMP-1, TIMP-2), а так же компонент цитоскелета и сигнального wnt-пути бета-катенин.

На первом этапе исследования проводилось изучение экспрессии исследуемых маркеров в зависимости от подтипа ПОЯ. Эндометриоидные опухоли ввиду малого количества наблюдений не учитывались.

В СПО экспрессия Ki-67 варьировала в пределах от 1% до 70%, экспрессия bcl-2, p53, p21 и циклина D1 – в пределах 0-90% соответственно, Вах и сурвивина – 0-100% соответственно.

В МПО реакция Ki-67 находилась в пределах от 1% до 20%, bcl-2, Вах и циклина D1 – в пределах 0-90% соответственно, p53 – 0-80%, p21 и сурвивина – 0-60% соответственно.

Отсутствие экспрессии ММР-1 в СПО отмечено в 35,2% случаев, в МПО – в 18,8% случаев. Слабая реакция – в 18,3% и 18,8% случаев, умеренная – в 16,9% и 37,5%, сильная – в 29,6% и 25% образцов соответственно.

Отсутствие экспрессии ММР-2 в СПО было выявлено в 83,5% случаев, в МПО – в 78,9% случаев. Слабая реакция – в 13,9% и 5,3% случаев, умеренная – в 2,5% и 5,3% опухолей со-

ответственно, сильная экспрессия данного маркера в СПО не была найдена, в МПО она отмечена в 10,5% случаев.

Отсутствие экспрессии MMR-9 в СПО отмечено в 31,6% случаев, в МПО – в 26,3% случаев. Слабая реакция – в 39,2% и 26,3% случаев, умеренная – в 15,2% и 21,1%, сильная – в 13,9% и 26,3% изученных опухолей соответственно.

Отсутствие экспрессии TIMP-1 в СПО обнаружено в 36,7% случаев, в МПО – в 36,8% случаев. Слабая реакция – в 43% и 31,6% случаев, умеренная – в 16,5% и 21,1%, сильная – в 3,8% и 10,5% опухолей соответственно.

Отсутствие экспрессии TIMP-2 в СПО выявлено в 79,5% случаев, в МПО – в 89,5% случаев. Слабая реакция – в 15,4% и 5,3% случаев, умеренная – в 5,1% и 5,3% случаев соответственно, сильная реакция данного маркера в пограничных опухолях не выявлена.

Отсутствие экспрессии бета-катенина отмечено в СПО в 6,8% случаев, в МПО – в 27,8% случаев. Слабая реакция – в 28,4% и 11,1% случаев, умеренная – в 32,4% и 38,9%, сильная – в 32,4% и 22,2% исследованных опухолей соответственно.

При проверке полученных данных на нормальность распределения, мы выявили, что в группе СПО распределение параметров было отличным от нормального ($p < 0,05$). Поэтому для дальнейшего сравнения этих групп использовались непараметрические критерии.

В результате сравнения серозных и муцинозных ПОЯ мы выявили, что экспрессия Ki-67, циклина D1, Вах, p53, сурвивина, MMR-1, MMR-2, MMR-9, TIMP-1, TIMP-2 и бета-катенина значимо не различалась в этих группах ($p > 0,05$). В то время как для bcl-2 и p21 различия оказались значимыми ($p < 0,05$). Исходя из обнаруженного отсутствия различий в экспрессии большинст-

ва маркеров в серозных и муцинозных ПОЯ, мы решили объединить эти группы для дальнейшего изучения иммуногистохимических маркеров в качестве возможных прогностических факторов.

Поскольку в группе рецидивных пограничных опухолей, муцинозный подтип выявлен лишь в одном случае, дальнейшее изучение маркеров bcl-2 и p21 будет продолжено только на серозных ПОЯ.

Пролиферативная активность опухоли напрямую связана с ее агрессивностью, поэтому для попытки прогнозирования рецидива ПОЯ мы изучили экспрессию Ki-67, как важнейшего маркера для оценки уровня пролиферации опухоли.

Уровень экспрессии **Ki-67** по нашим данным находился в пределах от 1% до 70% в пограничных опухолях без рецидивов и в диапазоне от 2% до 15 % – в рецидивных ПОЯ. В группе сравнения значения реакции варьировали от 2% до 60%. При этом во второй группе ПОЯ отмечено нормальное распределение величин этого маркера ($p > 0,05$), тогда в первой группе распределение величин было отличным от нормального ($p < 0,05$). В связи с этим для сравнения исследуемых групп использовались непараметрические критерии. Однако статистических различий в экспрессии маркера между исследуемыми группами пограничных опухолей выявлено не было ($p > 0,05$).

Однако обнаружены значимые различия в реакции Ki-67 между ПОЯ и высокодифференцированной аденокарциномой ($p=0,021$ по критерию Манна-Уитни).

При оценке методом процентилей в группе ПОЯ уровень экспрессии Ki-67 в 5% клеток соответствовал 25-му процентилю, а в 20% – 75-му. В группе аденокарцином 25-й процентиль был так же равен 5%, а 75-й – 30% (табл. 4.1, рис. 4.1). Таким

образом, отмечается увеличение уровня экспрессии Ki-67 (более 20%) в высокодифференцированных серозных аденокарциномах, по сравнению с пограничными опухолями (табл. 4.1, рис. 4.2, 4.3).

Таблица 4.1

Оценка экспрессии Ki-67 методом процентилей.

	ПОЯ	Аденокарцинома
Количество наблюдений	101	21
25-й процентиль	5%	5%
Медиана	10%	20%
75-й процентиль	20%	30%
Уровень экспрессии	–	Более 20%
Уровень значимости	p=0,021	

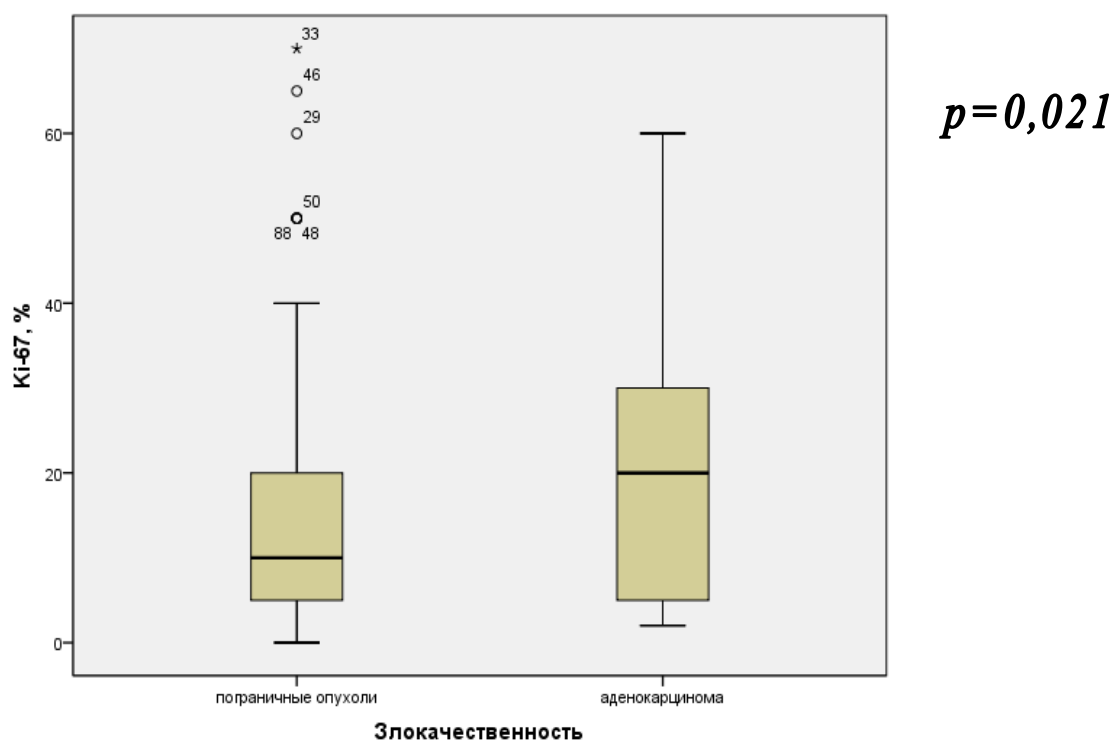


Рис. 4.1. Распределение экспрессии Ki-67 в ПОЯ и аденокарциномах.

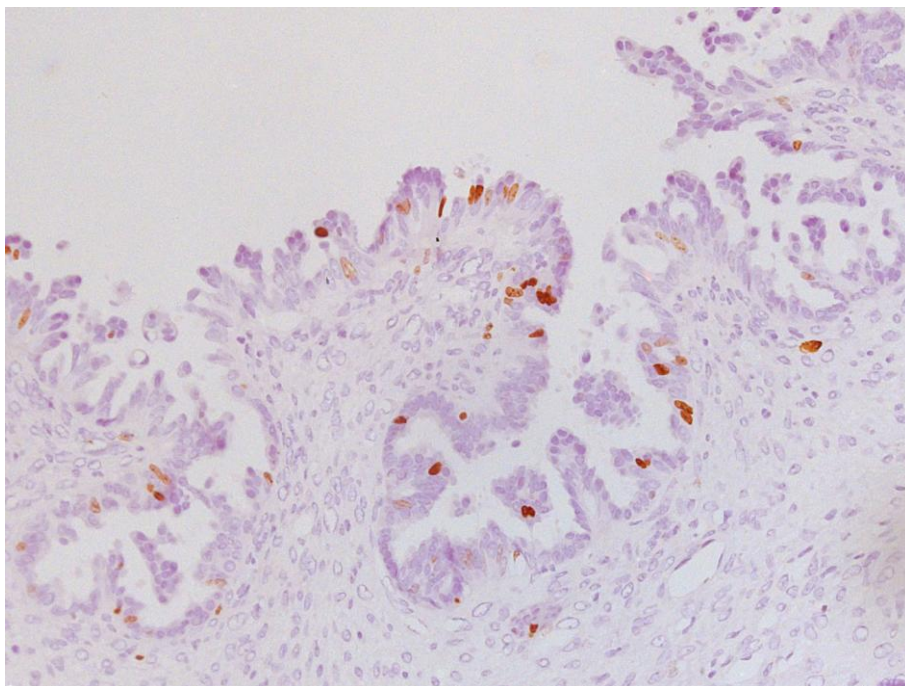


Рис.4.2. Экспрессия Ki-67 в ПОЯ. Иммуногистохимическое исследование с антителами к Ki-67, x200.

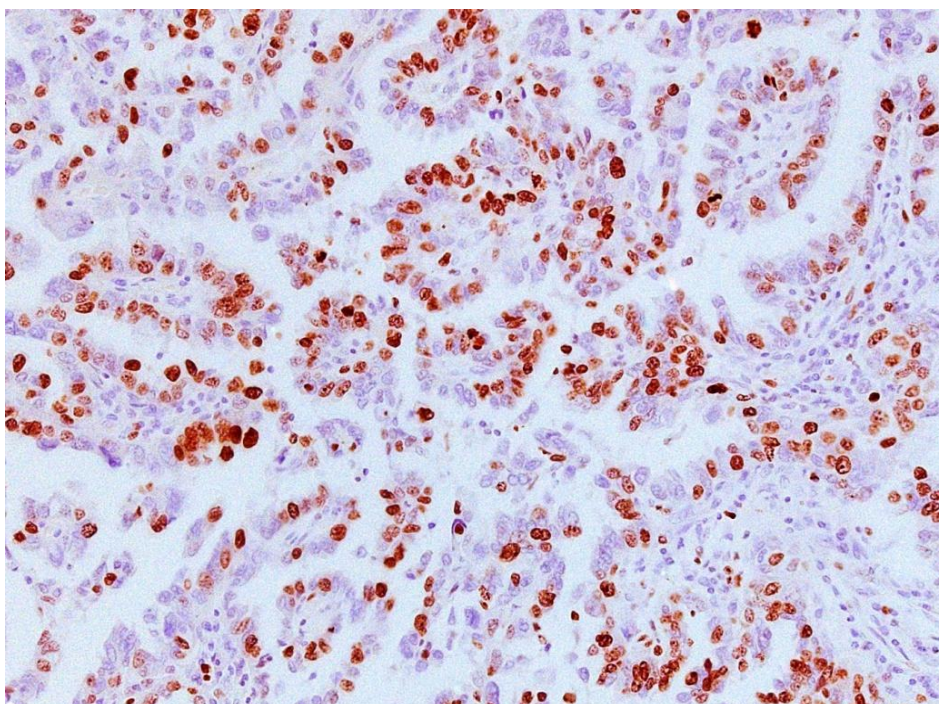


Рис. 4.3. Экспрессия Ki-67 в высокодифференцированной серозной аденокарциноме. Иммуногистохимическое исследование с антителами к Ki-67, x200.

Не менее важным белком, влияющим на пролиферацию клеток является активатор клеточного цикла – **циклин D1**. Выраженность его экспрессии находилась в пределах 0-90% как в обеих группах ПОЯ, так и в группе аденокарцином. При статистическом анализе было выявлено, что в группе пограничных опухолей, и в частности в подгруппе с рецидивом распределение значений этого маркера было отличным от нормального ($p < 0,05$). Поэтому для дальнейшего сравнения всех групп были использованы непараметрические критерии. Нами не было выявлено различий в экспрессии циклина D1 между группами ПОЯ (критерий Манна-Уитни, $p > 0,05$). Но степень выраженности маркера значимо различалась в пограничных опухолях и аденокарциномах (критерий Манна-Уитни, $p = 0,014$).

При оценке методом процентилей в группе ПОЯ 25-му процентилю соответствовал уровень экспрессии циклина D1, равный 3,5%, а 75-му – уровень экспрессии 60%. Во 2 группе 25-й процентиль был равен 30%, 75-й – 70% (табл. 4.2, рис. 4.4). Таким образом, выявляется снижение уровня экспрессии циклина D1 менее 30% в пограничных опухолях яичника, и усиление (более 60%) – в аденокарциномах (табл. 4.2, рис. 4.5).

Таблица 4.2

Оценка экспрессии циклина D1 методом процентилей

	ПОЯ	Аденокарцинома
Количество наблюдений	95	21
25-й процентиль	0%	30%
Медиана	27,5%	50%
75-й процентиль	60%	70%
Уровень экспрессии	Менее 30%	Более 60%
Уровень значимости	$p = 0,014$	

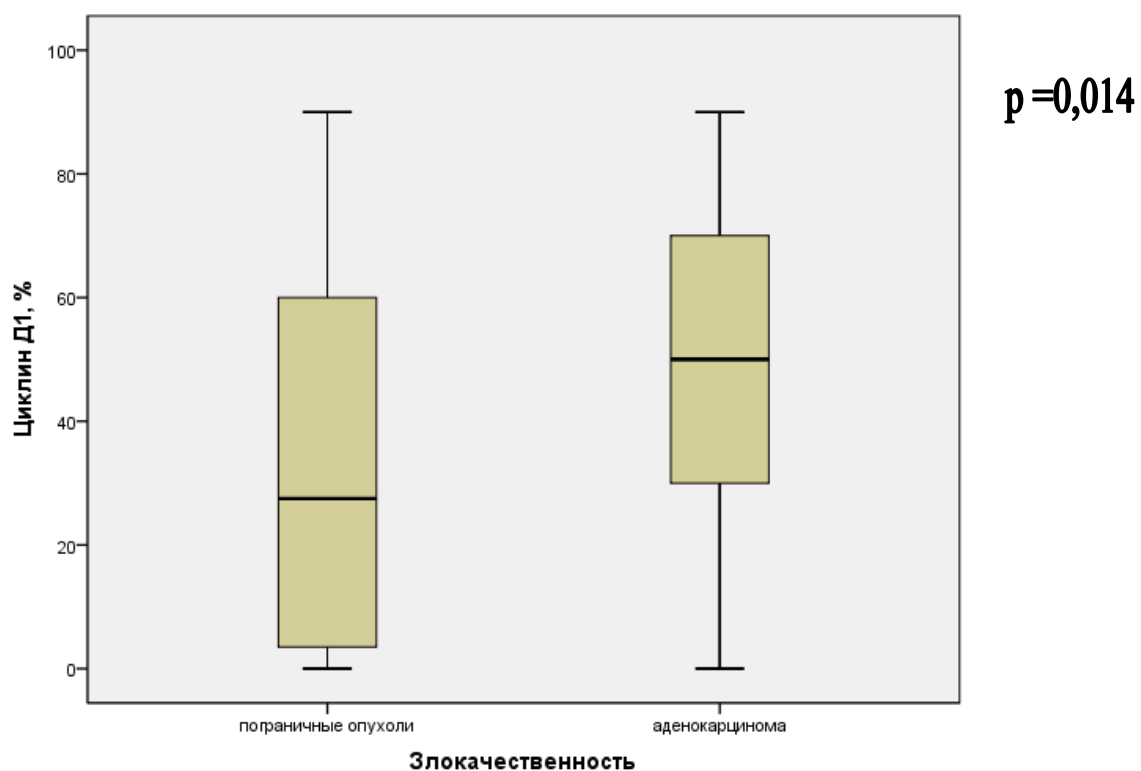


Рис. 4.4. Распределение экспрессии циклина D1 в ПОЯ и аденокарциномах.

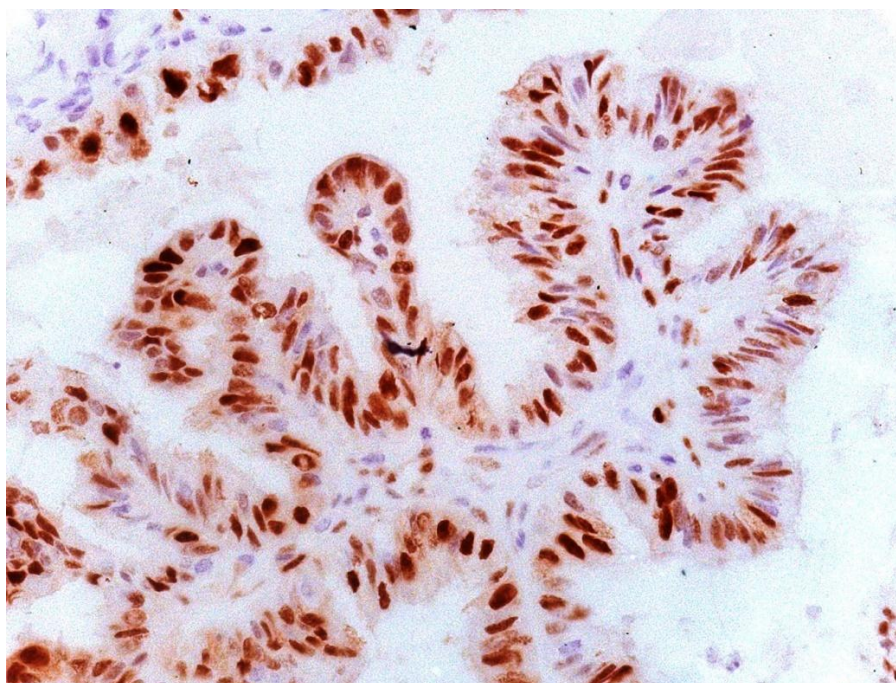


Рис. 4.5. Экспрессия циклина D1 в высокодифференцированной серозной аденокарциноме. Иммуногистохимическое исследование с антителами к циклину D1, x400.

Выраженность маркера bcl-2 находилась в пределах 1-95%.

Во всех исследуемых группах распределение значений данного маркера было отличным от нормального ($p < 0,05$), поэтому группы сравнивались при помощи непараметрических критериев. Значимых различий экспрессии bcl-2 в зависимости от отсутствия или наличия рецидива ПОЯ не было обнаружено ($p > 0,05$).

Однако выявлены различия между пограничными опухолями и аденокарциномами ($p = 0,004$ по критерию Манна-Уитни). 25-м процентилем в группе ПОЯ явился нулевой уровень (отсутствие) экспрессии bcl-2, 75-м – 15%. В группе аденокарцином 25-й процентиль был равен 3%, 75-й – 30% (табл. 4.3, рис. 4.6).

Таким образом, отмечено снижение экспрессии маркера менее 3% в ПОЯ и увеличение более 15% в аденокарциномах (табл. 4.3, рис. 4.7).

Таблица 4.3

Оценка экспрессии bcl-2 методом процентилей

	ПОЯ	Аденокарцинома
Количество Наблюдений	99	21
25-й процентиль	0%	3%
Медиана	2%	10%
75-й процентиль	15%	30%
Уровень Экспрессии	Менее 3%	Более 15%
Уровень экспрессии	$p = 0,004$	

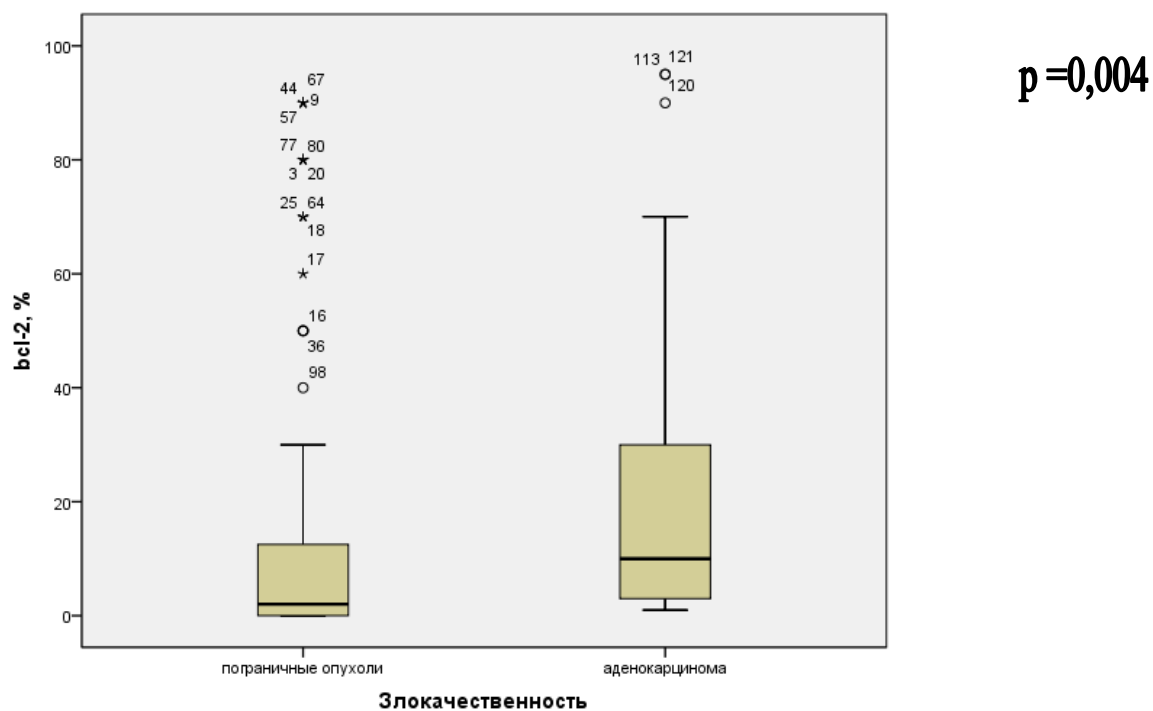


Рис. 4.6. Распределение экспрессии bcl-2 в ПОЯ и аденокарциномах.

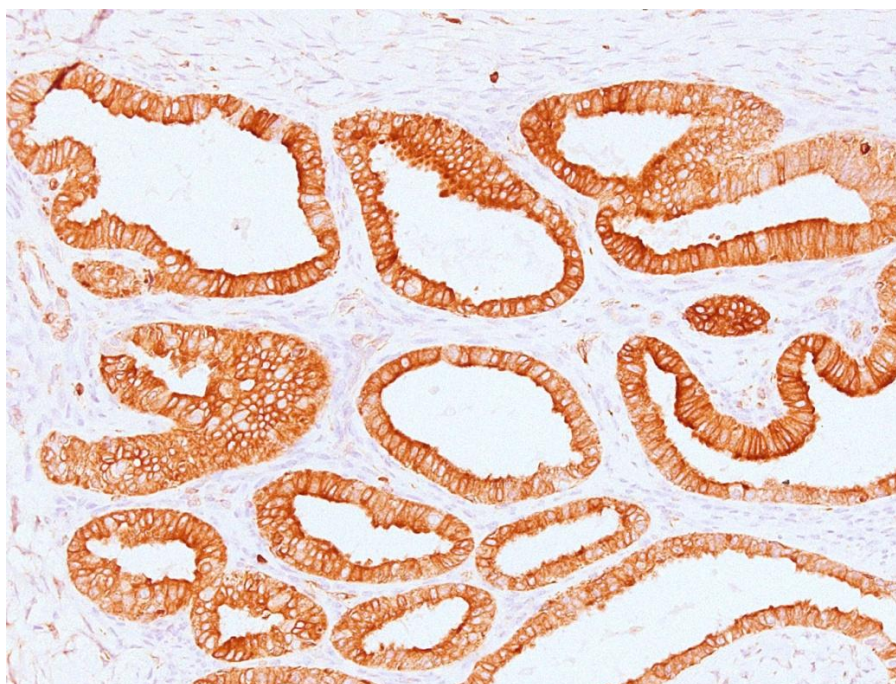


Рис. 4.7. Экспрессия bcl-2 в высокодифференцированной серозной аденокарциноме. Окрашивание более, чем 15% клеток опухоли. Иммуногистохимическое исследование с антителами к bcl-2, x200.

Протеин **Вах** является индуктором апоптоза. Его экспрессия в безрецидивных пограничных опухолях колебалась в пределах 0-95%, в ПОЯ с рецидивом – в пределах 0-90%. При статистическом анализе было выявлено, что в группе ПОЯ без рецидива распределение значений Вах отличалось от нормального, поэтому дальнейшее сравнение групп проводилось с использованием непараметрических критериев. Мы выявили, что степень выраженности этого маркера значимо различалась в опухолях 1 и 2 группы (критерий Манна-Уитни, $p = 0,043$).

При использовании метода процентилей, в 1 группе 25-м процентилем являлся уровень экспрессии 15%, а 75-м – 80%. Во 2 группе 25-му процентилю соответствовал уровень экспрессии 52%, а 75-му – 90% (рис. 4.8, табл. 4.4). Таким образом, значимым в опухолях без рецидивов является уровень экспрессии Вах менее 50%, тогда как в группе с рецидивами – выше 80% (критерий Манна-Уитни $p = 0,043$) (табл. 4.4, рис. 4.9, 4.10).

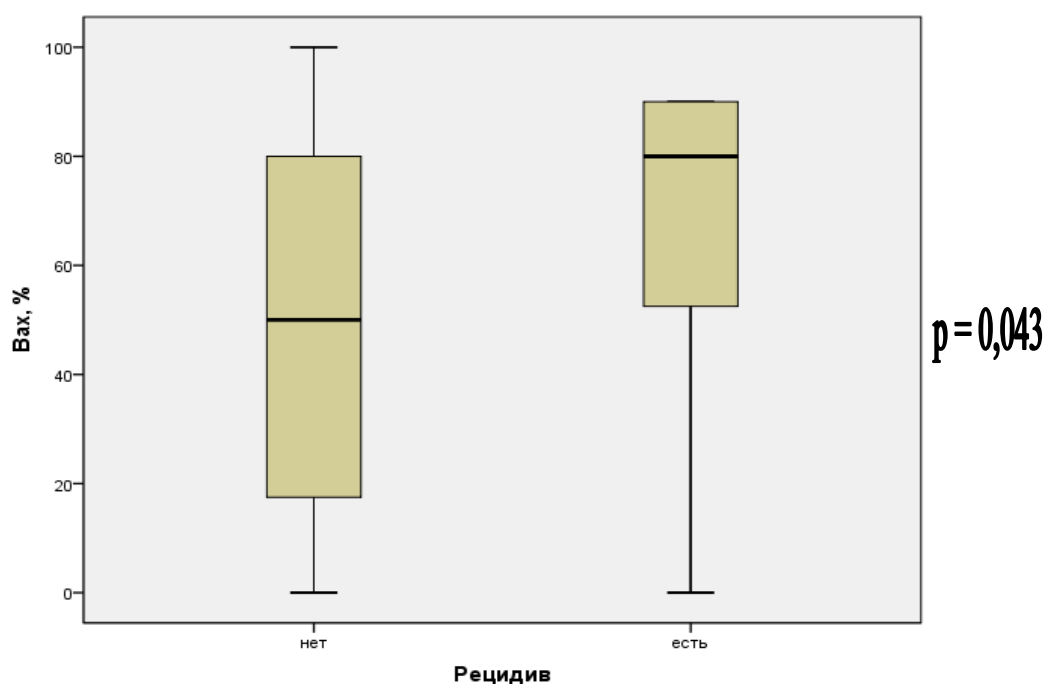


Рис. 4.8. Распределение экспрессии Вах в ПОЯ в зависимости от отсутствия или наличия рецидива.

Таблица 4.4

Оценка экспрессии Вах методом процентилей в группах ПОЯ

	Без рецидивов	Рецидивы
Количество наблюдений	67	18
25-й процентиль	15%	52%
Медиана	50%	80%
75-й процентиль	80%	90%
Уровень экспрессии	Менее 50%	Более 80%
Уровень экспрессии	$p = 0,043$	

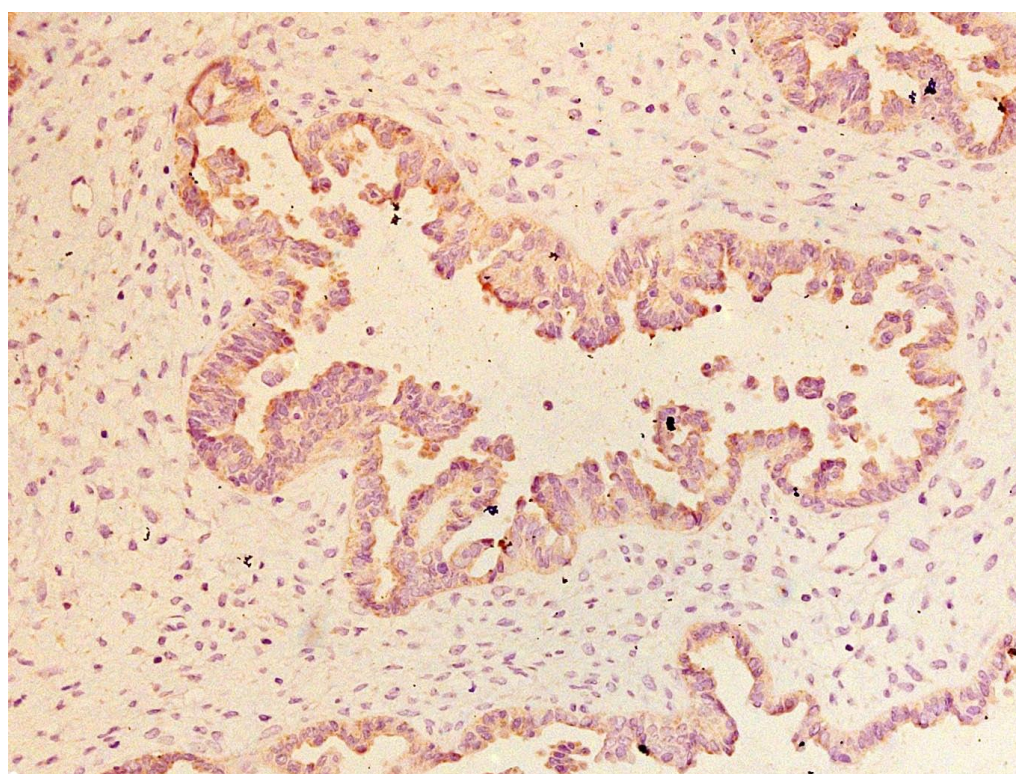


Рис. 4.9. Экспрессия Вах в ПОЯ без рецидива. Иммуногистохимическое исследование с антителами к Вах, х200.

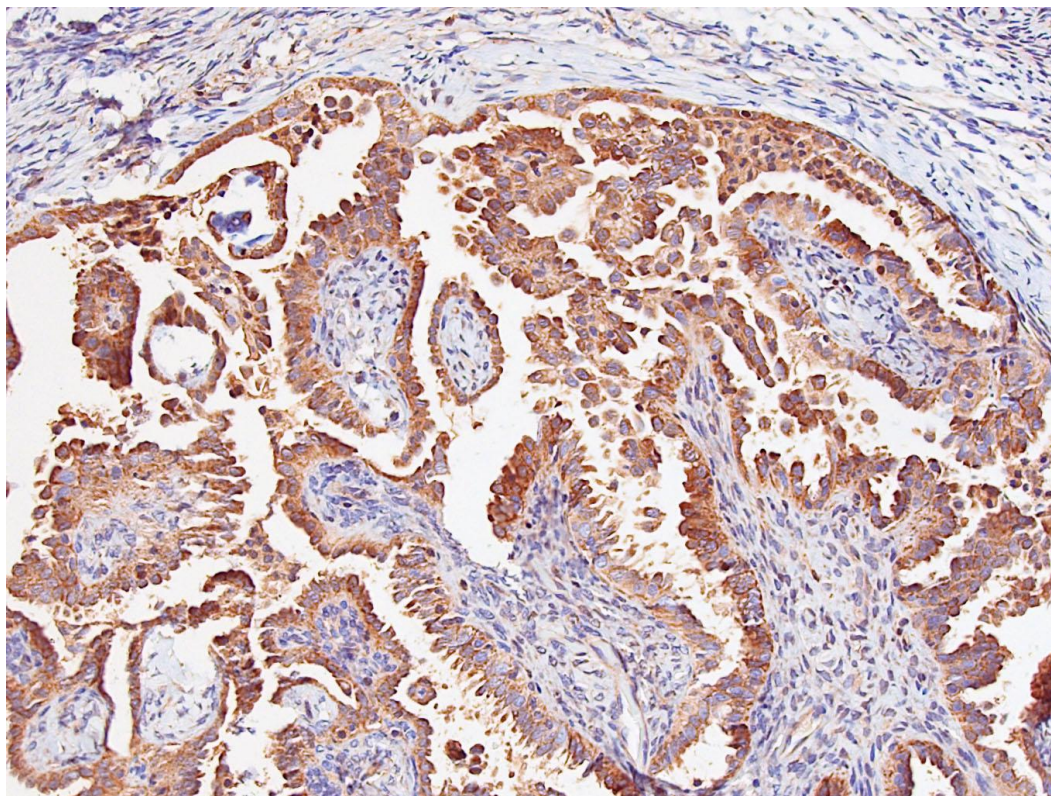


Рис. 4.10. Экспрессия Вах в рецидивной ПОЯ. Иммуногистохимическое исследование с антителами к Вах, х200.

При изучении реакции Вах на разных стадиях ПОЯ, при первой стадии 25-му и 75-му перцентилям соответствовали уровни экспрессии, равные 15% и 80%, при второй – 50% и 90%, при третьей – 30% и 80% соответственно (рис. 4.11, табл. 4.5).

Значимые различия выявлены в экспрессии Вах на I и II стадии ПОЯ (критерий хи-квадрат, $p = 0,05$) (табл. 4.5). При I стадии преобладала экспрессия Вах в менее чем 50% клеток опухоли, тогда как при II стадии выраженность маркера составляла более 80% (табл. 4.5). Значимых различий в экспрессии данного маркера между I и III, а так же между II и IV стадиями получено не было (хи-квадрат, $p > 0,05$).

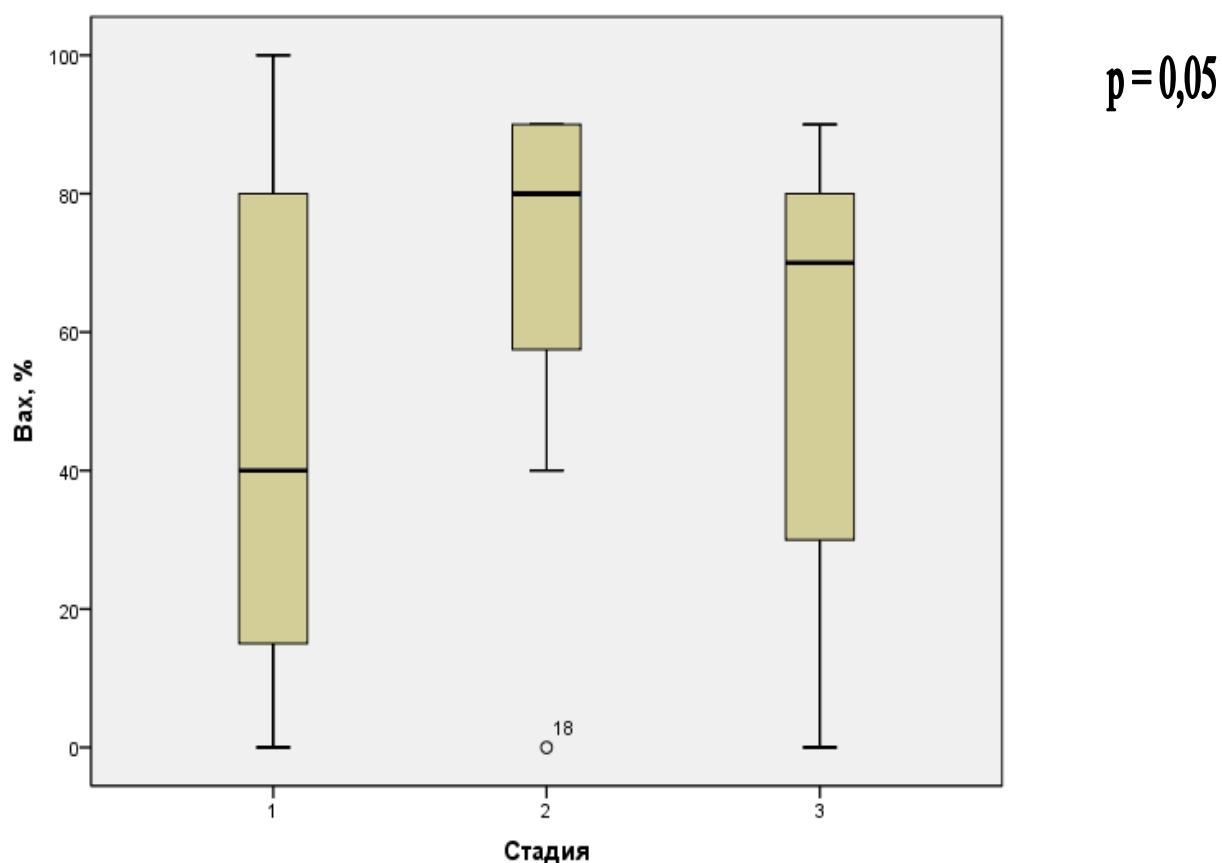


Рис.4.11. Распределение экспрессии Вax на разных стадиях ПОЯ.

Таблица 4.5

Оценка экспрессии Вax на разных стадиях ПОЯ

	I стадия	II стадия	III стадия
Количество наблюдений	59	15	9
25-й процентиль	15%	50%	30%
Медиана	40%	80%	70%
75-й процентиль	80%	90%	80%
Уровень экспрессии	Менее 50%	Более 80%	-
Уровень значимости	$p = 0,05$		

Во всех аденокарциномах отмечался высокий уровень экспрессии Вах (90% и более). При этом выраженность реакции значительно различалась в группе ПОЯ и аденокарцином (критерий Манна-Уитни, $p=0,004$). Так для пограничных опухолей более характерной явилась реакция менее, чем в 90% клеток, в то время как степень выраженности маркера в аденокарциномах была выше 90% (табл. 4.6).

Таблица 4.6

Оценка экспрессии Вах

	ПОЯ	Аденокарцинома
Количество наблюдений	83	5
25-й процентиль	20%	90%
Медиана	60%	90%
75-й процентиль	80%	99%
Уровень экспрессии	Менее 90%	90% и более
Уровень экспрессии	$p=0,004$	

P53 – это белок, тесно связанный с регуляцией транскрипции и роста клетки. Уровень экспрессии данного маркера варьировал в пределах от 0 до 90% в пограничных опухолях без рецидива, от 0 до 85% - в рецидивных ПОЯ и от 1% до 80% в группе аденокарцином. Статистический анализ выявил, что распределение значений в группе ПОЯ было отличным от нормального ($p < 0,05$), поэтому группы сравнивались при помощи непараметрических критериев. При сравнении исследуемых групп ПОЯ, в 1 группе 25-й и 75-й процентиля были равны 0% и 30%, во 2 группе – 5% и 40% соответственно. При сравнении группы ПОЯ с группой аденокарцином, в пограничных опухолях 25-й процентиль был равен 0%, 75-й – 30%, в группе сравнения зна-

чению 25-го и 75-го процентилей соответствовали уровни экспрессии, равные 1% и 20%. Однако значимых различий в реакции $p53$ между исследуемыми группами и группой сравнения не было обнаружено ($p > 0,05$; критерий Манна-Уитни).

P21 – белок ингибитор клеточного цикла, индуцируемый геном *TP53*. Реакция этого маркера в опухолях без рецидивов находилась в пределах 0-90% , в опухолях с рецидивами – 0-60%, в аденокарциномах – 3-80%. Так как в группе ПОЯ значения этого маркера были отличными от нормального , дальнейшее сравнение исследуемых групп проводилось с использованием непараметрических критериев. В группе ПОЯ без рецидива 25-й и 75-й процентиля были равны 10% и 40% соответственно, в группе рецидивных ПОЯ – 10% и 30% соответственно. Значимых различий экспрессии $p21$ между этими группами выявлено не было ($p > 0,05$; критерий Манна-Уитни).

При исследовании с группой сравнения, в пограничных опухолях 25-й и 75-й процентиля равнялись 10% и 40% соответственно, в аденокарциномах – 10% и 50% соответственно. Значимых различий между этими группами так же получено не было ($p > 0,05$; критерий Манна-Уитни).

Еще одним ингибитором апоптоза является белок **сурвивин**. Уровень его экспрессии колебался в пределах 0-99% в ПОЯ без рецидива и аденокарциномах и от 0 до 90% – в рецидивных ПОЯ. Распределение значений данного маркера во всех исследуемых группах отличалось от нормального ($p < 0,05$), поэтому для дальнейшего исследования применялись непараметрические критерии. В группе ПОЯ без рецидива и в группе с наличием рецидива значению 25-го перцентиля соответствовал нулевой уровень экспрессии сурвивина, 75-й перцентиль был равен 72,5% и 20% соответственно. Однако значимых различий экспрессии

между 1 и 2 группами ПОЯ не было выявлено ($p > 0,05$; критерий Манна-Уитни).

При сравнении пограничных опухолей и высокодифференцированных карцином, в группе ПОЯ нулевой уровень экспрессии соответствовал 25-му перцентилю, реакция в 70% клеток – 75-му. В группе аденокарцином 25-му и 75-му перцентильям соответствовал уровень экспрессии 70% и 90% соответственно (табл. 4.7, рис. 4.12). Нами были выявлены статистически значимые различия реакции сурвивина в ПОЯ и аденокарциномах ($p=0,002$; критерий Манна-Уитни).

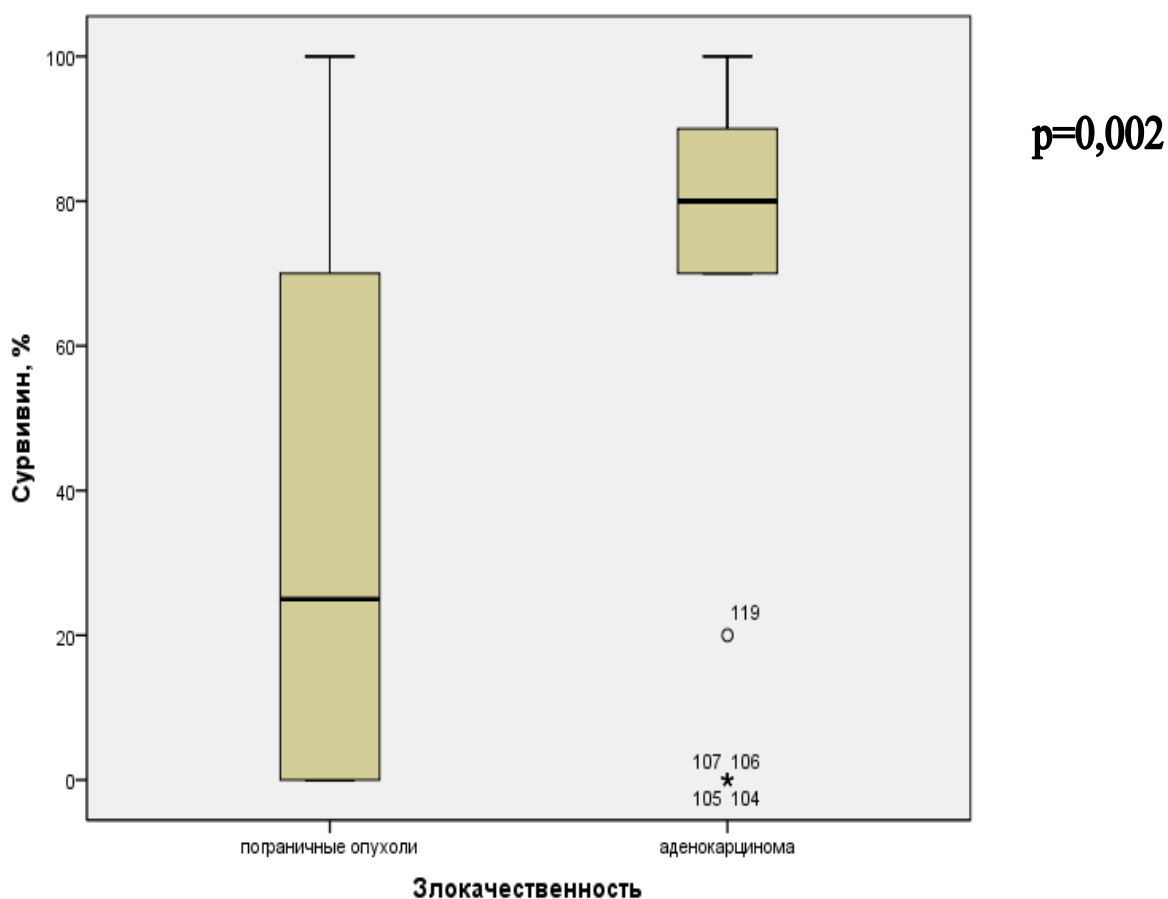


Рис. 4.12. Распределение экспрессии сурвивина в ПОЯ и аденокарциномах.

Таблица 4.7

Оценка экспрессии сурвивина методом процентилей

	ПОЯ	Аденокарцинома
Количество наблюдений	96	21
25-й процентиль	0%	70%
Медиана	25%	80%
75-й процентиль	70%	90%
Уровень экспрессии	Менее 70%	Более 70%
Уровень значимости	p=0,002	

Межтканевая металлопротеиназа **ММР-1** отвечает за миграцию опухолевых клеток. В группе безрецидивных ПОЯ отсутствие экспрессии маркера наблюдалось в 34,7% (25) случаев, слабая реакция наблюдались в 19,4% (14) случаев, умеренная – в 23,6% (17), сильная – в 22,2 % (16).

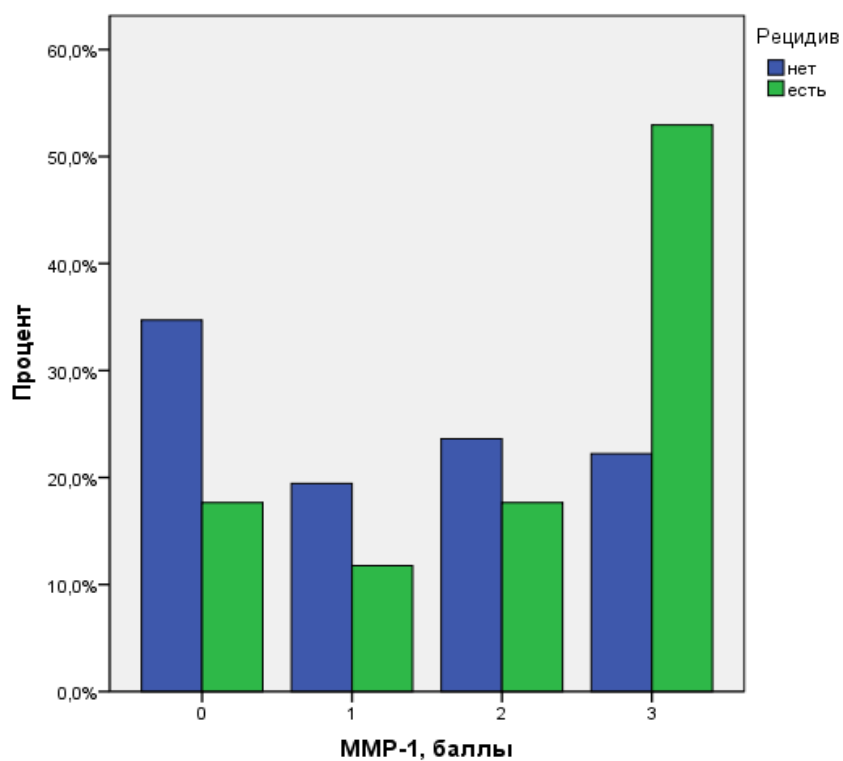
В группе рецидивных ПОЯ отсутствие реакции наблюдалось в 17,6% (3) случаев, слабая реакция – в 11,8% (2), умеренная реакция – в 17,6% (3), сильная реакция встречалась в 52,9% (9) случаев. При изучении зависимости реакции от наличия/отсутствия рецидивов было отмечено значимое повышение частоты выраженной экспрессии ММР-1 в рецидивных ПОЯ (метод Манна-Уитни, $p = 0,024$) (табл. 4.8, рис. 4.13, 4.14).

Таблица 4.8

Экспрессия ММР-1 в ПОЯ

ММР-1	0	1+	2+	3+
Без рецидива	25 34,7%	14 19,4%	17 23,6%	16 22,2%

Рецидив	3	2	3	9
	17,6%	11,8%	17,6%	52,9%



$p=0,024$

Рис. 4.13. Экспрессия ММР-1 в исследуемых группах ПОЯ.

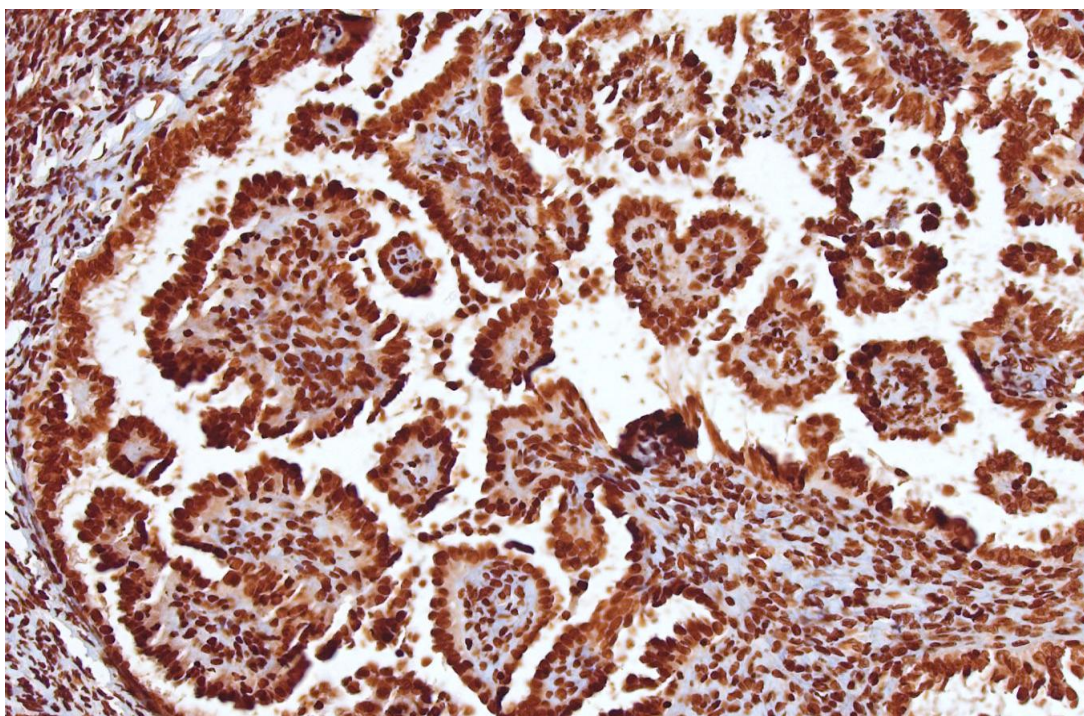


Рис. 4.14. Выраженная экспрессия (+++) ММР-1 при реци-

диве ПОЯ. Иммуногистохимическое исследование с антителами к MMP-1, x200.

Так же была выявлена положительная корреляция в экспрессии MMP-1 и Вах при рецидиве пограничных опухолей (коэф. Спирмена = 0,23; $p = 0,045$).

Значимых различий в экспрессии этого маркера между группой пограничных опухолей и группой аденокарцином выявлено не было ($p > 0,05$; критерий Манна-Уитни).

MMP-2 является одним из ферментов, способным разрушить коллаген IV типа. Отсутствие реакции в опухолях без рецидивов наблюдалось в 70 случаях (84,3%), умеренная реакция – в 8 (9,6%) случаях, слабая – в 3 (3,6%) случаях, выраженная – в 2-х (2,4%).

В группе с рецидивами отсутствие реакции выявлено в 13 (72,2%) случаях, слабая реакция – в 5 (27,8%), умеренная и сильная реакция отсутствовали (табл. 4.9).

Мы не обнаружили статистически значимых различий в исследованных группах ПОЯ, а так же в группе сравнения (критерий Манна-Уитни, $p > 0,05$).

Таблица 4.9

Экспрессия MMP-2 в ПОЯ

MMP-2	0	1+	2+	3+
Без рецидива	70 84,3%	8 9,6%	3 3,6%	2 2,4%
Рецидив	13 72,2%	5 27,8%	0 0%	0 0%

Протеиназа **MMP-9**, так же способна разрушать коллаген

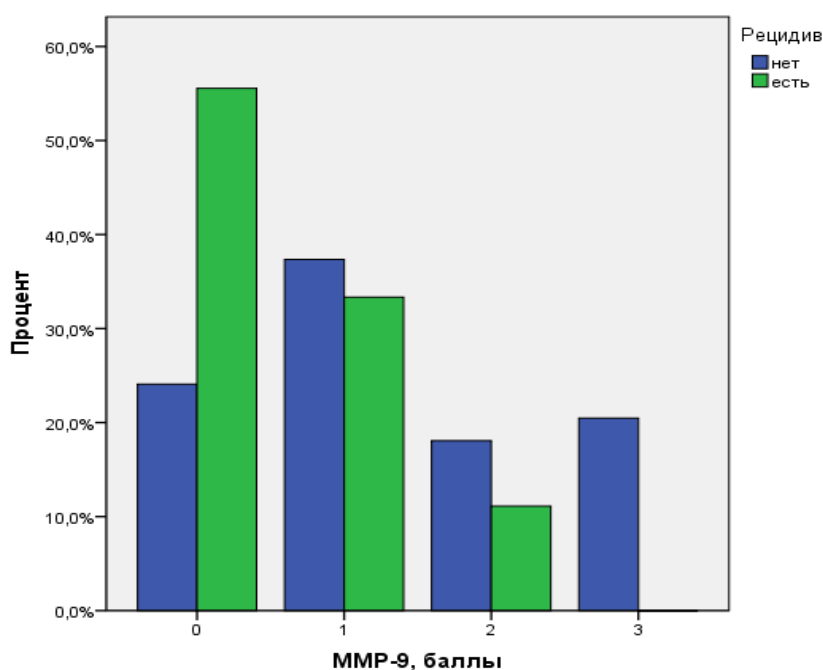
IV типа. В 1 группе отсутствие реакции наблюдалось в 24,1% (20) случаев, слабая реакция – в 37,3% (31), умеренная – в 18,1%, выраженная – в 20,5%.

Во 2 группе отсутствие экспрессии наблюдалось в 55,6% (10), слабая реакция выявлена в 33,3% (6), умеренная реакция – в 11,1% (2), сильная реакция не наблюдалась. Нами было выявлено значимое снижение и отсутствие экспрессии ММР-9 при рецидивах ПОЯ ($p = 0,003$, критерий Манна-Уитни) (табл. 4.10, рис. 4.15, 4.16, 4.17).

Таблица 4.10

Экспрессия ММР-9 в ПОЯ

ММР-9	0	1+	2+	3+
Без рецидива	20 24,1%	31 37,3%	15 18,1%	17 20,5%
Рецидив	10 55,6%	6 33,3%	2 11,1%	0 0%



$p = 0,003$

Рис. 4.15. Экспрессия ММР-9 в исследуемых группах ПОЯ.

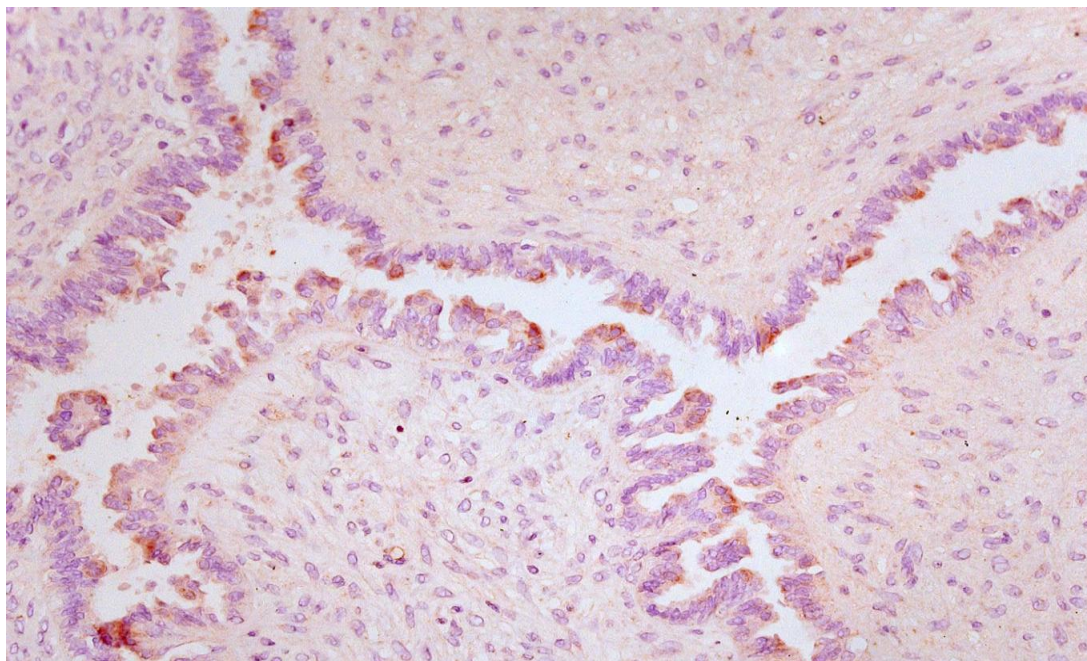


Рис. 4.16. Слабая реакция (+) MMP-9 при рецидиве ПОЯ. Иммуногистохимическое исследование с антителами к MMP-9, х200.

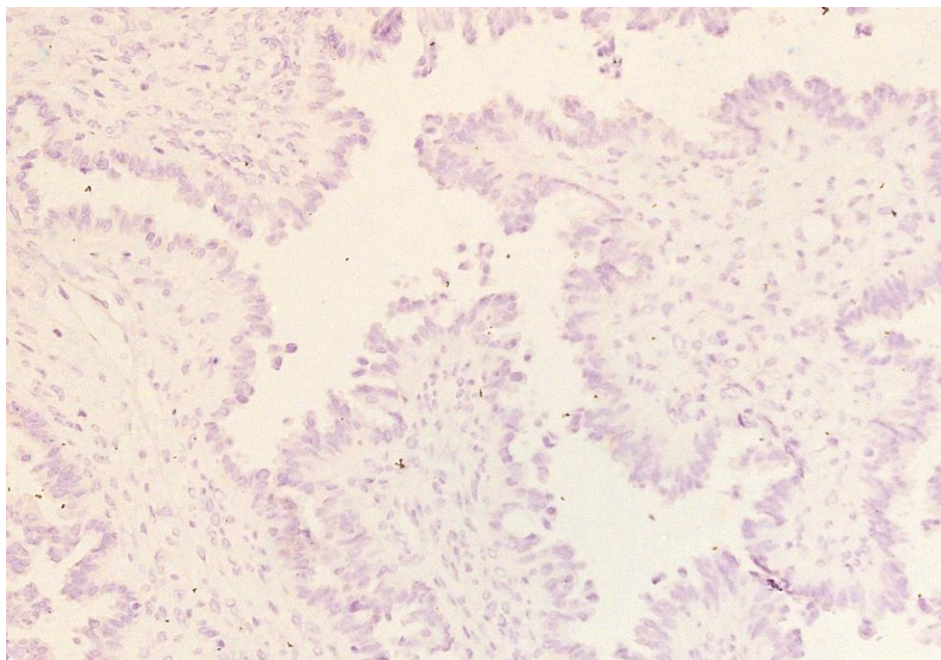


Рис. 4.17. Отсутствие экспрессии MMP-9 при рецидиве ПОЯ. Иммуногистохимическое исследование с антителами к MMP-9, х200.

При сравнении группы пограничных опухолей с группой аденокарцином статистически значимых различий обнаружено не было ($p > 0,05$; критерий Манна-Уитни).

Ингибиторы протеаз **TIMP-1** и **TIMP-2**, регулируют активность этих ферментов на различных уровнях и могут быть связаны с неблагоприятным прогнозом во многих опухолях.

Отсутствие реакции TIMP-1, слабая, умеренная и выраженная экспрессия маркера в пограничных опухолях без рецидивов выявлялась в 37,3% (31), 34,9% (29) и 20,5% (17) и 7,2% (6) случаев соответственно. Выраженное окрашивание не наблюдалось.

В группе рецидивов ПОЯ отсутствие экспрессии выявлено в 33,3% (6) случаев, слабая реакция – в 66,7% (12). Умеренное и выраженное окрашивание отсутствовали. Значимых различий в экспрессии данного маркера в зависимости от отсутствия или наличия рецидива ПОЯ обнаружено не было ($p > 0,05$ по критерию Манна-Уитни).

Однако при оценке уровня экспрессии TIMP1 в пограничных опухолях и аденокарциномах нами были выявлены значимые различия ($p=0,0001$ по критерию Манна-Уитни) (табл. 4.11, 4.12).

Таблица 4.11

Экспрессия TIMP-1 в ПОЯ

TIMP-1	0	1+	2+	3+
Без рецидива	31 37,3%	29 34,9%	17 20,5%	6 7,2%
Рецидив	6 33,3%	12 66,7%	0 0%	0 0%

Отсутствие реакции маркера в ПОЯ отмечено в 36,6% (37) случаев, слабая реакция – в 40,7% (41), умеренная – в 16,8% (17), выраженная – в 5,9% (6).

В аденокарциномах отсутствие окрашивания выявлено в 9,5% (2) случаев, доля слабого окрашивания составила 28,5% (6), умеренного – 42,9% (9), выраженного – 19,1% (4).

Таблица 4.12

Экспрессия TIMP-1 в ПОЯ и аденокарциномах

TIMP-1	0	1+	2+	3+
ПОЯ	37 36,6%	41 40,7%	17 16,8%	6 5,9%
А/К	2 9,5%	6 28,5%	9 42,9%	4 19,1%

Нами обнаружено, что в пограничных опухолях преобладает отсутствие и слабая выраженность реакции TIMP-1, тогда как в аденокарциномах чаще выявлена умеренная и сильная экспрессия маркера ($p < 0,0001$, критерий Манна-Уитни) (рис. 4.18).

Отсутствие реакции TIMP-2 отмечено в 84,1% (69) случаев в пограничных опухолях 1 группы, и в 61,1% (11) – во второй. Доля слабой экспрессии составила 11% (9) в 1-ой группе и 27,8% (5) – во 2-ой. Умеренное окрашивание встречалось в 3,7% (3) и 11,1% (2) случаев соответственно. Выраженная реакция составила 1,2% случаев в ПОЯ без рецидивов. В рецидивных пограничных опухолях отсутствовало выраженное окрашивание данного маркера.

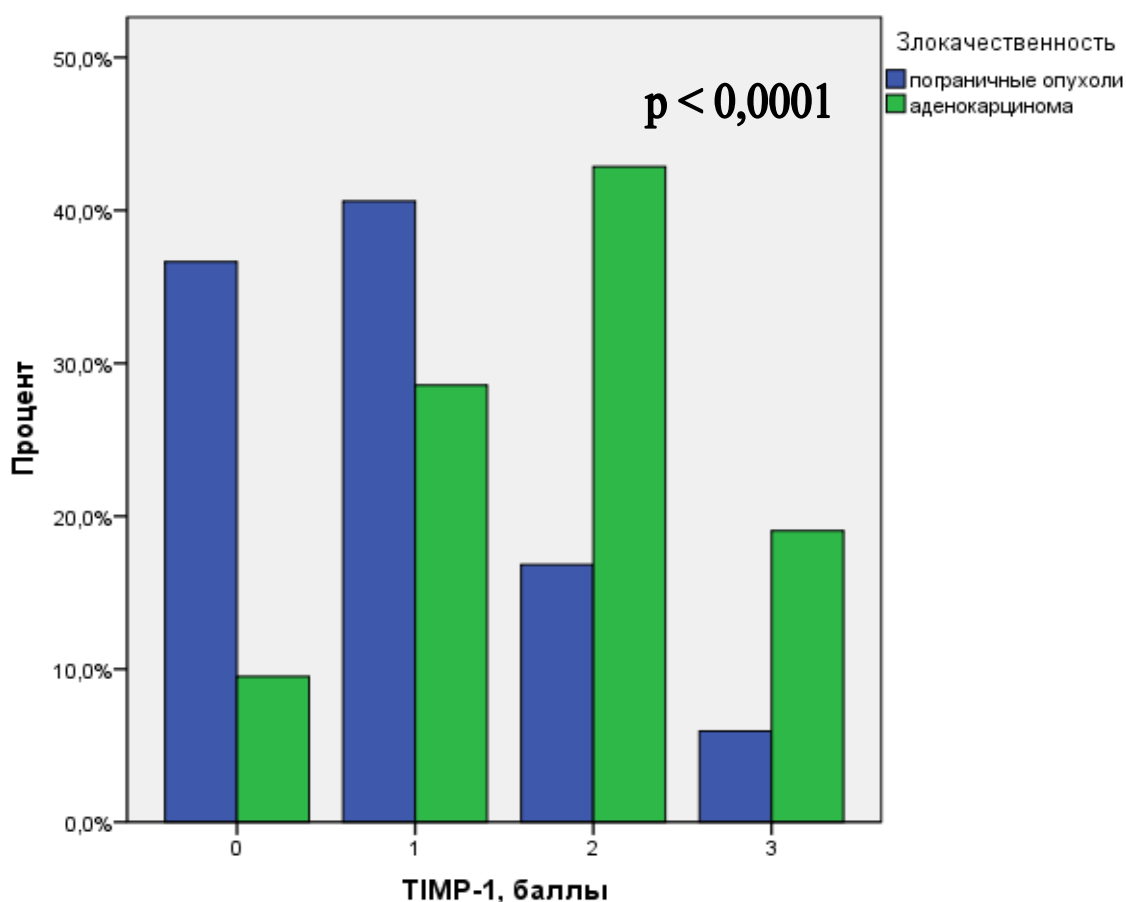


Рис. 4.18. Экспрессия TIMP-1.

Нами выявлено значимое отсутствие реакции данного маркера в ПОЯ без рецидивов, а так же слабое и умеренное окрашивание в рецидивных опухолях ($p=0,03$; критерий Манна-Уитни) (табл. 4.13, рис. 4.19, 4.20).

Таблица 4.13

Экспрессия TIMP2 в ПОЯ

TIMP-2	0	1+	2+	3+
Без рецидива	69 84,1%	9 11,0%	3 3,7%	1 1,2%
Рецидив	11 61,1%	5 27,8%	2 11,1%	0 0%

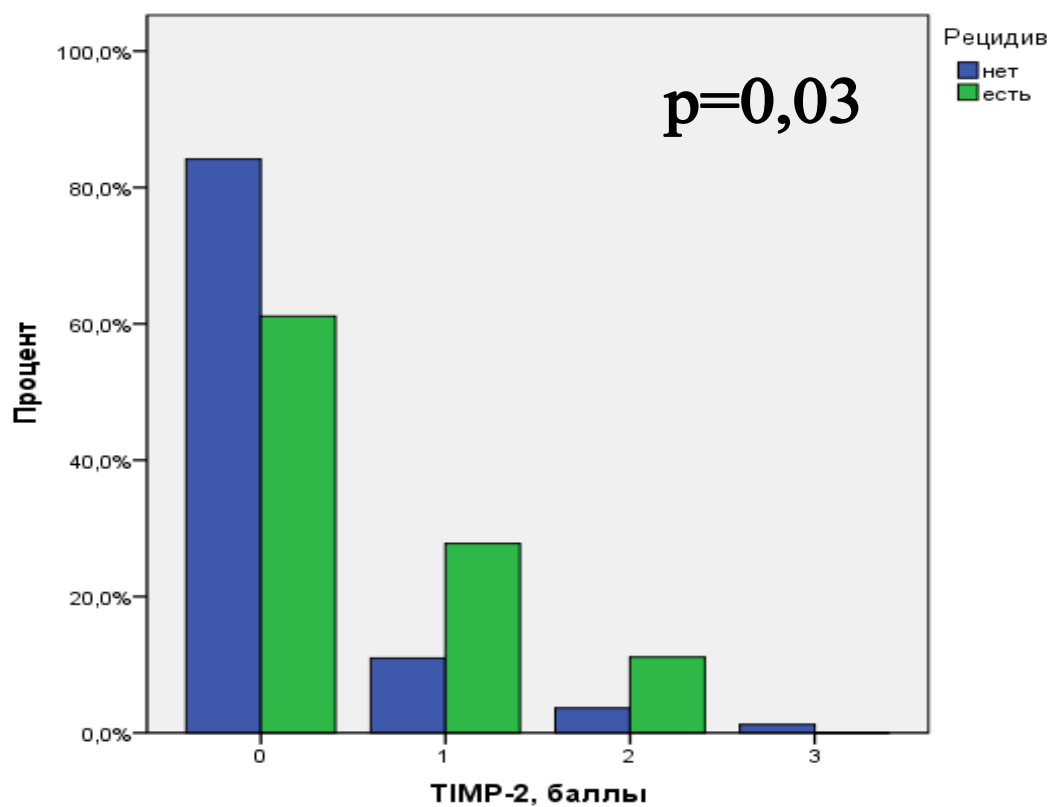


Рис. 4.19. Экспрессия TIMP-2.

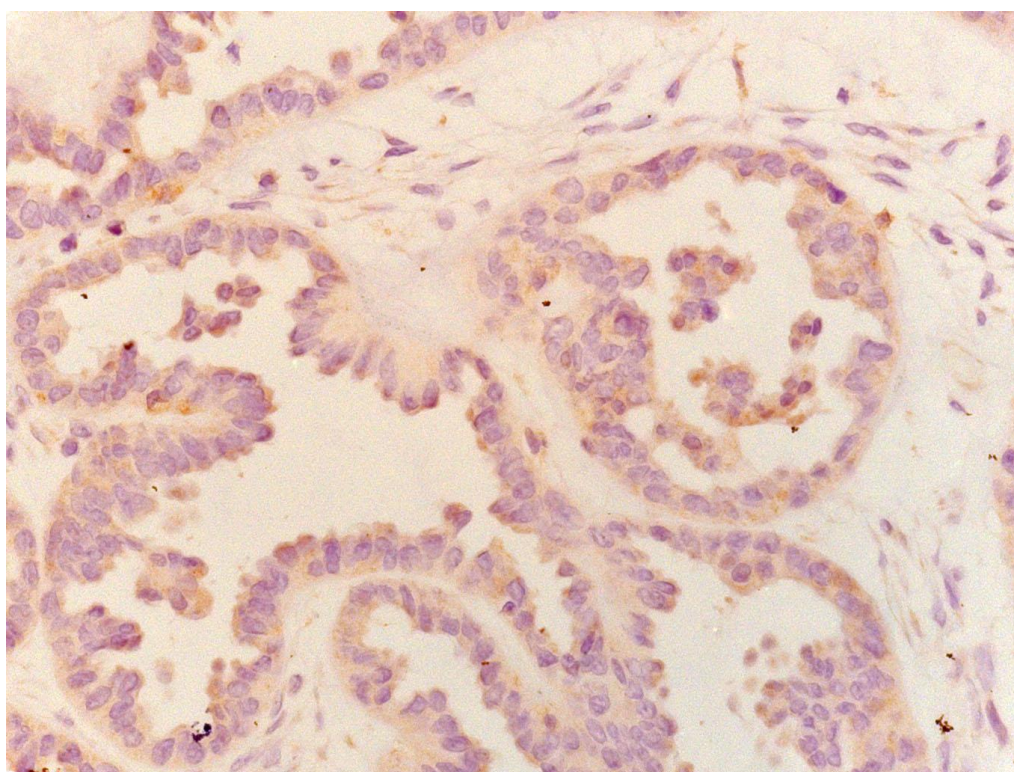


Рис. 4.20. Слабая реакция TIMP-2 рецидивной ПОЯ. Иммуногистохимическое исследование с антителами к TIMP-2, x200.

Значимых различий в экспрессии этого маркера между группой пограничных опухолей и группой аденокарцином выявлено не было ($p > 0,05$; критерий Манна-Уитни).

Белок **бета-катенин** играет многогранную роль в клетке, являясь с одной стороны важным компонентом цитоскелета, с другой – являясь активатором транскрипции в сигнальном Wnt пути.

В 1 группе ПОЯ отсутствие реакции было выявлено в 9 (11,4%) наблюдениях, слабая реакция – в 25 (31,6%), умеренная реакция встречалась в 28 (35,5%) случаях, сильная реакция – в 17 (21,5%).

Во 2 группе отсутствие реакции наблюдалось в 1 (6,3%) случае, слабая реакция не встречалась, умеренная реакция была выявлена в 3 (18,7%) наблюдениях, сильная реакция – в 12 (75,0%). При оценке экспрессии В-катенина в ПОЯ, было отмечено значимое усиление экспрессии В-катенина в рецидивных опухолях ($p = 0,0001$; критерий Манна-Уитни) (табл. 4.14, рис. 4.21, 4.22).

Таблица 4.14

Экспрессия бета-катенина в ПОЯ

В-катенин	0	1+	2+	3+
Без рецидива	9 11,4%	25 31,6%	28 35,5%	17 21,5%
Рецидив	1 6,3%	0 0%	3 18,7%	12 75,0%

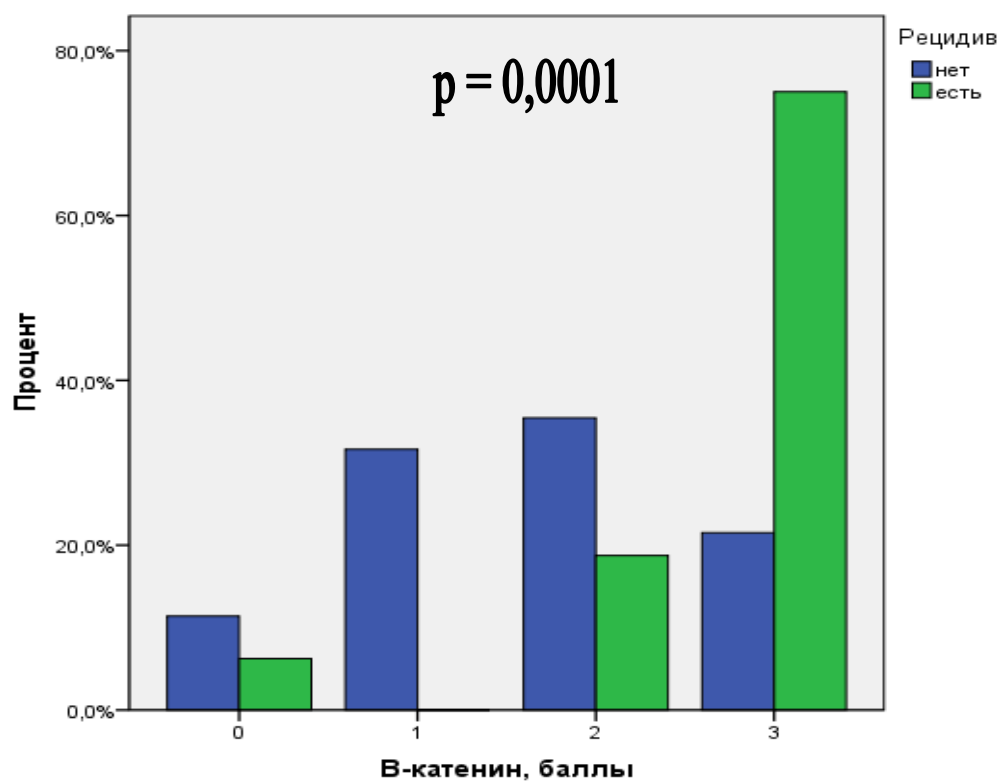


Рис. 4.22. Экспрессия бета-катенина в ПОЯ.

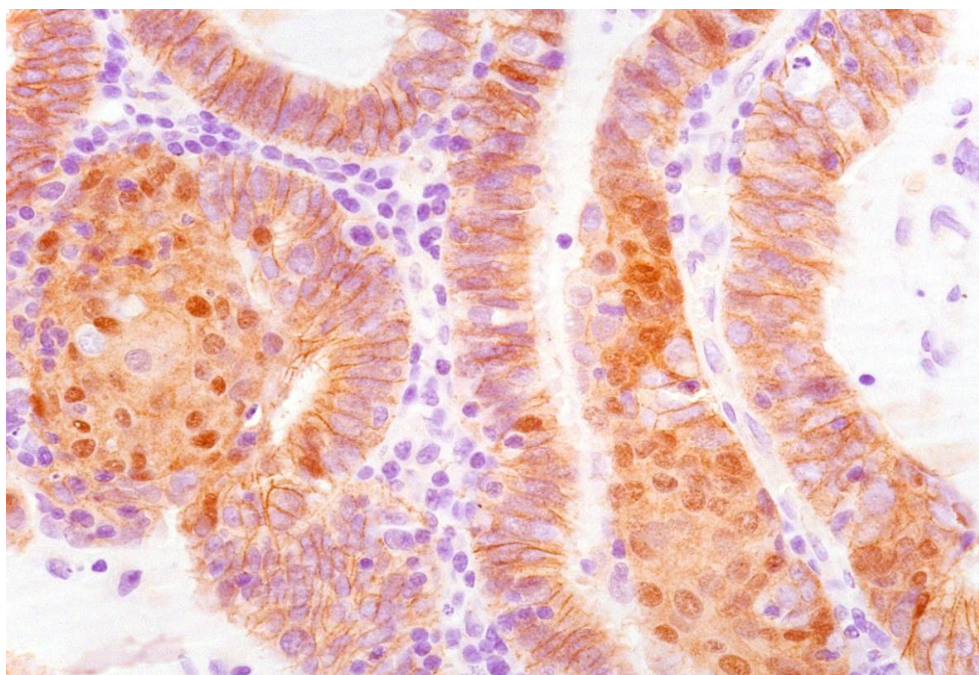


Рис. 4.22. Выраженная экспрессия бета-катенина (+++) при рецидиве ПОЯ. Иммуногистохимическое исследование с антителами к бета-катенину, х400.

Так же нами были выявлены различные уровни реакции бета-катенина на разных стадиях ПОЯ. Так, при I стадии отсутствие реакции отмечено в 8,7% случаев, слабая реакция – в 29,0%, умеренная – в 39,1%, доля выраженной реакции составила 23,2% случаев. При II стадии отсутствие и умеренная экспрессия выявлены в 6,3% случаев соответственно, доля слабой экспрессии составила 18,8%, выраженной – 68,8%. На III стадии отсутствие и умеренное окрашивание обнаружено в 30% соответственно, доля слабого и выраженного окрашивания составила по 20%.

При I стадии отмечено значимое увеличение умеренной реакции ($p = 0,014$, критерий Манна-Уитни) (табл. 4.15), в то время как на II стадии значимо возрастает количество случаев с выраженной экспрессией бета-катенина ($p = 0,041$, критерий Манна-Уитни) (табл. 4.15, рис. 4.23).

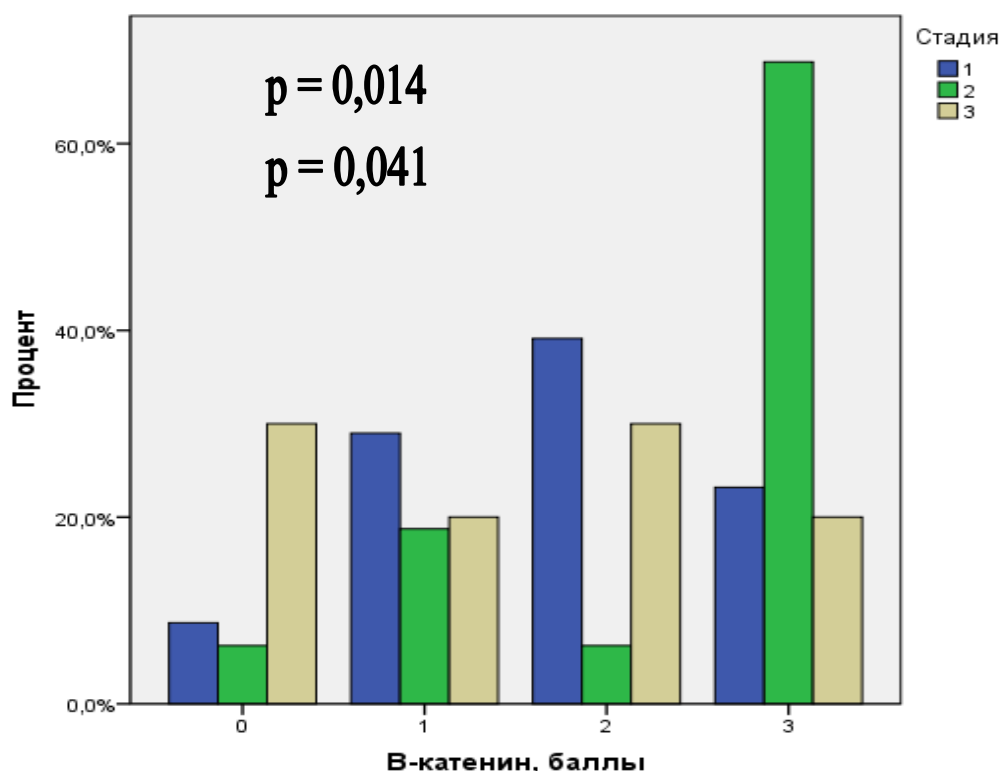


Рис. 4.23. Экспрессия бета-катенина на разных стадиях ПОЯ.

Таблица 4.15

Экспрессия бета-катенина в ПОЯ

В-катенин	0	1+	2+	3+
I стадия	8,7%	29,0%	39,1%	23,5%
II стадия	6,3%	18,8%	6,3%	68,8%
III стадия	30%	20%	30%	20%

Значимых различий в экспрессии этого маркера между группой пограничных опухолей и группой аденокарцином выявлено не было ($p > 0,05$; критерий Манна-Уитни).

Анализ *BRAF* мутаций

В нашем исследовании мутация p.V600E (рис. 4.25) была выявлена в 11,9% (12) случаях ПОЯ (табл. 4.16).

В группе без рецидивов мутация обнаружена 34,8% (8) случаев, в группе с рецидивами – в 23,5% (4).

Статистически, группы значимо не различались ($p > 0,05$).

Таблица 4.16

***BRAF* мутации в ПОЯ**

<i>BRAF</i> мутация	Группа без рецидивов	Группа с рецидивами	Всего
+	9,6% (8)	22,3% (4)	11,9% (12)
–	90,4% (75)	77,7% (14)	88,1% (89)

+ мутация есть.

– мутации нет.

При анализе группы сравнения, мутация p.V600E была выявлена в 23,8% (5/21) случаев высокодифференцированной серозной аденокарциномы и в 11,9% (12/101) при ПОЯ (табл.4.17).

Статистически группы значимо не различались ($p > 0.05$).

Таблица 4.17

***BRAF* мутации в ПОЯ и аденокарциномах**

<i>BRAF</i> мутация	ПОЯ	Аденокарцинома	Всего
+	11,9% (12)	23,8% (5)	13,9% (17)
–	88,1% (89)	76,2% (16)	86,1% (105)

+ мутация есть.

– мутации нет.

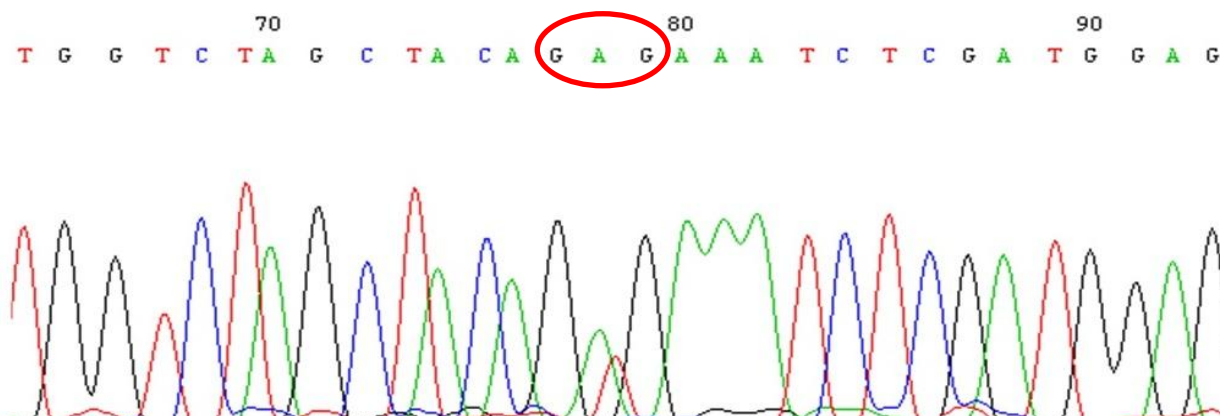


Рис. 4.24. Сиквенс гена *BRAF*.

Глава 5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Морфологические факторы прогноза

Нами было выявлено, что подавляющее большинство исследованных случаев ПОЯ (78,2%) были представлены серозным подтипом. Другие варианты ПОЯ были в значительном меньшинстве, так муцинозные опухоли отмечены в 18,8% случаев, эндометриоидные – в 3%. ПОЯ без рецидивов были представлены на 74,7% (62) серозным подтипом, на 21,7% (18) - муцинозным, на 3,6% (3) - эндометриоидным. В группе рецидивных ПОЯ лишь одна опухоль (5,6%) оказалась муцинозной, остальные (94,4%) были серозными.

Несмотря на известный факт, что импланты встречаются гораздо чаще при серозном подтипе ПОЯ, что предопределяет более благоприятное течение других пограничных опухолей и сниженный риск рецидивов, при изучении распределения типов ПОЯ в исследуемых группах, значимых статистических различий в исследуемых группах выявлено не было (критерий хи-квадрат, $p > 0,05$). Возможно, данный факт связан с недостаточной статистической выборкой, поэтому следует продолжить изучение биологического поведения пограничной опухоли в зависимости от ее гистологического типа на большем количестве наблюдений.

Импланты были выявлены в 26,7% (27) случаях ПОЯ. В группе без рецидивов они встречались в 15,7% (13) случаев, а в группе с рецидивами – в 77,8% (14). При этом в 1 группе все выявленные импланты были неинвазивными, тогда как во 2 группе, в двух случаях (14,3%) отмечены инвазивные импланты, доля неинвазивных имплантов составила 85,7% (12).

При этом нами были выявлены статистические значимые

различия в частоте встречаемости имплантов в исследуемых группах (критерий хи-квадрат, $p < 0,0001$) (рис. 5.1). Было установлено увеличение частоты обнаружения имплантов у пациентов с наличием рецидивов ПОЯ. Возможно, это обусловлено тем, что при наличии перитонеальных имплантов в брюшной полости могут оставаться не выявленные при ревизии микроскопические очаги ПОЯ, которые и являются субстратом развития рецидива. Таким образом, вероятность развития рецидива у пациенток с наличием имплантов составляет 51,9% ($p < 0,0001$ по критерию хи-квадрат).

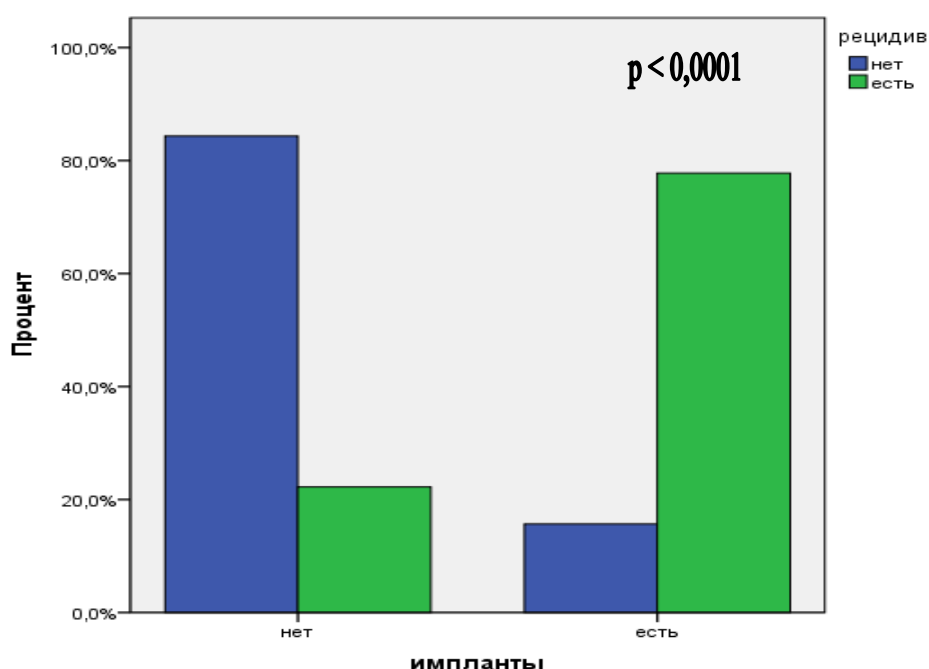


Рис. 5.1. Частота встречаемости имплантов в исследуемых группах ПОЯ.

Инвазивные импланты по морфологической картине были более схожи с высокодифференцированной (low grade) серозной аденокарциномой, тогда как в первичном очаге морфологическая картина соответствовала типичной серозной ПОЯ.

В литературе мы встретили данные о том, что при дополнительной вырезке материала ПОЯ с наличием инвазивных им-

плантов, в первичном очаге, среди структур пограничной опухоли обнаруживаются очаги инвазивной высокодифференцированной аденокарциномы [58, 181, 182].

Поэтому нами была предпринята тщательная дорезка с блоков первичной опухоли. В результате, при микроскопическом исследовании обеих рецидивных ПОЯ с наличием инвазивных имплантов, в дополнительных срезах, на фоне пограничной опухоли, в яичнике были выявлены микроочаги инвазивной высокодифференцированной серозной аденокарциномы, которые, вероятнее всего и послужили источником метастазирования.

Таким образом, нами подтвердились высказывания ряда авторов о том, что в типичных ПОЯ могут обнаруживаться только неинвазивные импланты. Обнаружение инвазивных имплантов при ПОЯ должно подтолкнуть патологоанатома к дальнейшему тщательному исследованию первичного очага (1 блок/1 см³) для поиска скрытых очагов высокодифференцированной аденокарциномы.

Псаммомные тельца были выявлены в 30 случаях (29,7%) всех ПОЯ. У пациенток с наличием рецидива они были отмечены в 50% случаев, а у пациенток без рецидивов – в 25,3%. При этом были обнаружены статистически значимые различия между исследуемыми группами. Мы выявили, что псаммомные тельца чаще встречаются в рецидивных опухолях, а вероятность развития рецидива при наличии этого признака составляет 30% (критерий хи-квадрат, $p = 0,049$) (рис. 5.2). Это может быть связано с тем, что в псаммомных тельцах выявляется повышенное содержание коллагена IV типа, что может послужить причиной активации металлопротеиназ, задействованных в процессах миграции и инвазии опухолевых клеток.

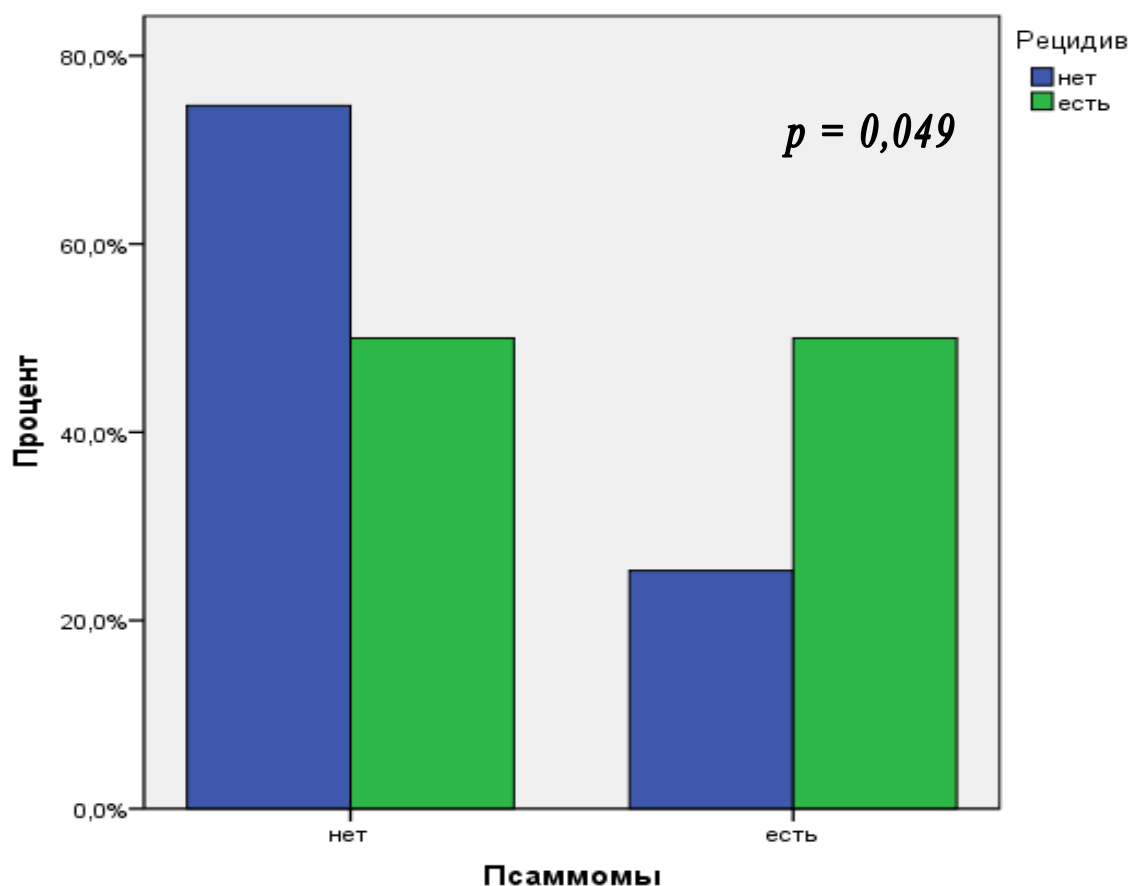


Рис. 5.2. Частота встречаемости псаммозных телец в исследуемых группах ПОЯ.

Микрососочковая гистоархитектура опухоли выявлена нами в 8 случаях (7,9%). При этом все случаи были представлены рецидивными ПОЯ.

В пограничных опухолях без рецидива микрососочковые структуры не выявлялись.

Статистические различия между исследуемыми группами оказались значимыми.

Мы установили, что наличие микропапиллярных структур наиболее характерно для рецидивных опухолей. Вероятность развития рецидива у пациенток с микрососочковой СПО составляет 99,9% ($p < 0,0001$) (рис. 5.3).

Полученные нами результаты подтверждаются последними

данными литературы, включая новую классификацию ВОЗ опухолей женской репродуктивной системы, переизданную в 2014 году [215].

Согласно этой классификации, теперь к микропапиллярным серозным пограничным опухолям должен применяться термин «неинвазивная low-grade серозная карцинома», а при морфологическом кодировании после дроби указывается цифра 2(карцинома in situ), что указывает на более высокую биологическую агрессивность этих опухолей.

Агрессивность микрососочковых опухолей, вероятно, связана с тем, что при неиерархическом ветвлении сосочков, отсутствии фиброзной стромы, а так же активации протеаз, связанных с клеточной миграцией, снижается адгезия опухолевых клеток, увеличивая риск их имплантации. Это в свою очередь может привести к реализации рецидива.

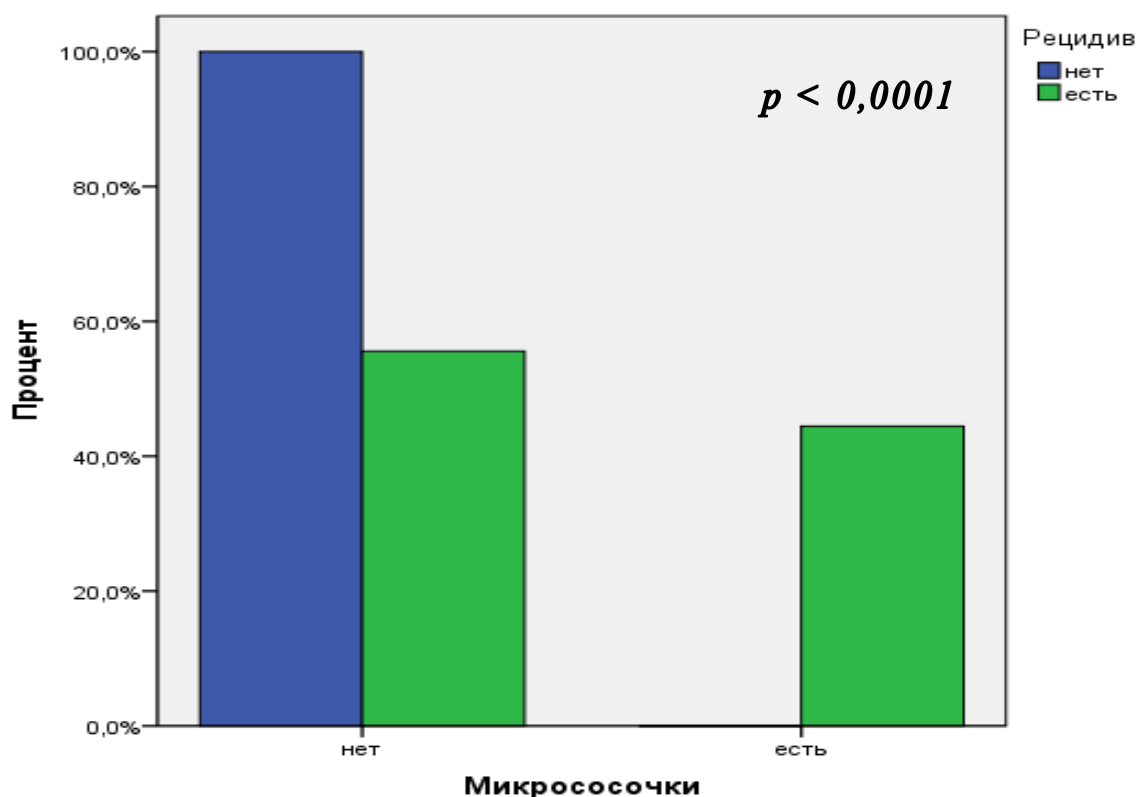


Рис. 5.3. Частота встречаемости микрососочковых структур в исследуемых группах ПОЯ.

Молекулярно-биологические факторы прогноза

В качестве прогностических факторов для возможного развития рецидивов пограничных опухолей яичников мы изучали экспрессию маркеров пролиферации (Ki-67, cyclin D1), апоптоза (bcl-2, Вах, сурвивин), супрессоров опухолевого роста (p53, p21), матриксных металлопротеиназ (ММР-1, ММР-2, ММР-9), их тканевых ингибиторов (TIMP-1, TIMP-2), а так же к бета-катенина (компонента цитоскелета и сигнального wnt-пути). В качестве группы сравнения были использованы случаи высокодифференцированных серозных аденокарцином на фоне серозной пограничной опухоли.

В результате проведенного исследования, при изучении пролиферативной активности, не было выявлено значимых различий экспрессии Ki-67 в зависимости от отсутствия или наличия рецидива ПОЯ. В то же время, при исследовании группы сравнения, мы выявили, что для высокодифференцированных аденокарцином, в отличие от пограничных опухолей, характерна экспрессия Ki-67 более, чем 20% ($p=0,021$, критерий Манна-Уитни).

Полученные результаты согласуются с данными мировой литературы, в которой имеются указания на тот факт, что степень пролиферативной активности увеличивается от пограничной опухоли яичников к low-grade карциноме [85].

Циклин D1 – протоонкоген, являющийся активатором клеточного цикла. Его гиперэкспрессия описана во множестве карцином [71, 81, 125, 136, 214].

Нами не обнаружено статистически значимых различий экспрессии данного маркера в исследуемых группах пограничных опухолей, однако различия были обнаружены при сравнении ПОЯ с группой аденокарцином. Так в пограничных опухолях ре-

акция циклина была значимо ниже 30%, в то время как для аденокарцином его экспрессия составила 60% и более ($p = 0,014$, критерий Манна-Уитни).

Низкий уровень пролиферативных сигналов и, как следствие, слабая экспрессия циклина D1 может объяснить столь индолентное поведение ПОЯ. Однако мы не встретили литературных данных, касательно прогностической значимости этого маркера для ПОЯ.

В опубликованных исследованиях мы обнаружили данные, согласующиеся с полученными нами результатами, а именно о наличии гиперэкспрессии циклина D1 при серозном раке яичников [75, 92, 199, 218].

Известно, что белок p21 обладает ингибирующим влиянием на клеточный цикл, и его слабая экспрессия могла быть признаком агрессивного потенциала опухоли или неблагоприятным прогностическим фактором [85]. Однако мы не выявили значимых различий его реакции ни в исследуемых группах ПОЯ, ни в группе сравнения ($p > 0,05$; критерий Манна-Уитни).

Экспрессия мутантного белка p53 – важный критерий прогноза злокачественных новообразований разных локализаций и дифференциальной диагностики предопухолевых процессов. Одним из самых ранних событий онкогенеза является мутация в гене этого белка, приводящая к синтезу аномального продукта. При оценке экспрессии p53 не было выявлено ее связи с наличием или отсутствием рецидивов ПОЯ.

При сравнении с группой аденокарцином значимых различий так же выявлено не было ($p > 0,05$; критерий Манна-Уитни). Этот факт, в определенной степени подтверждает, что для пограничных опухолей и высокодифференцированной серозной аденокарциномы характерны другие мутации (*K-ras*, *BRAF* и

редко *TP53*). [82, 141, 153].

Изменение соотношения ингибиторов и индукторов апоптоза играет существенную роль в развитии многих новообразований.

Так, протеин bcl-2 является ингибитором апоптоза и для разных карцином показана его различная прогностическая ценность, однако в литературе практически отсутствуют данные по изучению этого маркера в ПОЯ.

В исследованном нами материале не было выявлено зависимости уровня экспрессии этого маркера от отсутствия или наличия рецидивов пограничной опухоли яичников ($p > 0,05$, критерий Манна-Уитни). Но были выявлены статистически значимые различия при сравнении реакции данного маркера между ПОЯ и высокодифференцированными серозными аденокарциномами. ПОЯ характеризовались экспрессией bcl-2 менее, чем в 3% клеток, в то время как уровень экспрессии в аденокарциномах был значимо выше 15% ($p = 0,004$, критерий Манна-Уитни), что можно объяснить более интенсивным ингибированием апоптоза и, как следствие, более агрессивным потенциалом аденокарцином.

Протеин Вах является антагонистом bcl-2 и, следовательно, индуктором апоптоза. В литературе имеются сообщения о том, что высокая экспрессия Вах характерна для пограничных и злокачественных опухолей яичника по сравнению с доброкачественными, однако исследования, посвященные изучению связи этого маркера с биологическим поведением именно пограничных опухолей яичника, в настоящее время отсутствуют.

Наше исследование показало усиление экспрессии Вах в группе с рецидивами выше 80% и снижение менее 50% в группе опухолей без рецидивов. Таким образом, значимым в опухолях без рецидивов является уровень экспрессии Вах менее 50%, то-

гда как в группе с рецидивами – выше 80% (критерий Манна-Уитни, $p = 0,043$).

Аналогичные цифры получены при сравнении реакции данного маркера в зависимости от стадии ПОЯ. Так в опухолях I стадии экспрессия Вах была значимо ниже 50%, при II стадии – выше 80% ($p=0,05$; критерий Манна-Уитни). Полученные результаты характеризуют Вах как маркер агрессивности ПОЯ. При сравнении пограничных и злокачественных опухолей было выявлено, что для аденокарцином характерным являлся уровень экспрессии Вах 90% опухолевых клеток и выше, тогда как интенсивность этого маркера для ПОЯ была значимо ниже 90% ($p=0,004$).

Обнаруженная нами усиленная экспрессия белка Вах в аденокарциномах не является прямым показателем усиления апоптотической активности в опухолевых клетках при раке, т.к. важен не собственно уровень проапоптотических и антиапоптотических белков, а их соотношение, в частности соотношение Bcl2/Bах.

Вероятно, для опухолей яичников повышение уровня экспрессии Bcl 2 превышает усиление экспрессии Вах, что ведет к уменьшению числа опухолевых клеток, которые вступают в процесс запрограммированной клеточной гибели. Кроме того, важно отметить выявленный высокий уровень экспрессии внутриклеточного белка сурвивина, который также ингибирует апоптоз и участвует в митотическом делении клеток. Поэтому ни один из этих маркеров не может является единственным показателем апоптотической активности опухолевых клеток и требуется изучение их количественного соотношения [7].

Сурвивин – это эндогенный белок из семейства ингибиторов апоптоза (IAP), принимающий участие в регуляции клеточ-

ного деления и апоптоза. Считается, что его выраженная экспрессия для многих опухолей ассоциирована с плохим прогнозом и низкой выживаемостью. Однако исследования о прогностической значимости этого протеина для ПОЯ в настоящее время в литературе отсутствуют.

В ходе нашего исследования прогностической значимости экспрессии сурвивина для ПОЯ не было получено ($p > 0.05$, критерий Манна-Уитни). Однако при исследовании группы сравнения нами было выявлено, что для аденокарцином характерна экспрессия сурвивина в более чем 70% клеток. В то время как при пограничных опухолях реакция этого маркера была значимо менее 70% ($p = 0,002$; критерий Манна-Уитни). Полученные результаты в целом согласуются с данными литературы, описывающими гиперэкспрессию сурвивина при раке различных локализаций [15, 192]

Бета-катенин – белок, участвующий в активации транскрипции в сигнальном Wnt пути, тем самым, влияя на пролиферацию клеток.

В литературе имеются данные о том, что экспрессия бета-катенина становится более интенсивной, начиная от нормального эпителия кист-включений, к цистаденомам и пограничным опухолям, достигая наибольшей выраженности в карциномах яичника [174]. При этом, в высокодифференцированных опухолях наблюдается более выраженная экспрессия, по сравнению с низкодифференцированными раками. Этот факт можно объяснить повышением накопления белка бета-катенина вследствие мутации гена *CTNNB1*.

В нашем исследовании в ПОЯ без рецидива преобладала слабая и умеренная реакция данного маркера (31,6% и 35,5% соответственно), в то время как в большинстве рецидивных опухо-

лей выявлена выраженная экспрессия бета-катенина (75,0%). При этом, различия были статистически значимыми ($p=0,0001$, критерий Манна-Уитни).

Таким образом, для рецидивных опухолей характерна выраженная экспрессия бета-катенина, что можно объяснить увеличением мутаций гена *CTNNB1*, и как следствие, более агрессивный биологический потенциал таких образований. Так же нами были выявлены статистически значимые различия экспрессии бета-катенина для разных стадий ПОЯ ($p=0,041$, критерий Манна-Уитни). При I стадии чаще выявлялась слабая и умеренная экспрессия маркера (29,0% и 39,1% соответственно); в опухолях II стадии преобладала выраженная экспрессия (68,8); при III стадии имело место примерно одинаковая частота всех уровней экспрессии.

Подобный характер экспрессии маркера может отражать важный этап прогрессирования ПОЯ, когда уровень бета-катенина значимо повышается при переходе от первой стадии ко второй и сопровождается экстраовариальное распространение опухоли, постепенно снижаясь при дальнейшем прогрессировании. Этот факт может иметь большое клиническое значение и требует дальнейшего изучения.

Матриксные металлопротеиназы (ММР) – класс ферментов из группы эндопротеаз. Эти мембранные белки разрушают компоненты внеклеточного матрикса, в частности, ММР-1, ММР-2 и ММР-9 играют ключевую роль в деградации коллагена IV типа, основного компонента базальных мембран, чем способствуют инвазии и метастазированию опухолей.

Результаты исследования ММР-1 показали значимое усиление ее экспрессии в рецидивных ПОЯ (метод Манна-Уитни, $p<0,05$), что скорее всего связано с повышением инвазивного и

миграционного потенциала опухоли, так как по данным литературы, повышенная экспрессия ММР-1 связана с инвазией и миграцией клеток рака яичника [59, 111, 144].

В нашем исследовании мы не выявили значимых различий экспрессии ММР-2 в группах ПОЯ и в группе сравнения ($p > 0,05$; критерий Манна-Уитни). При изучении данных других исследователей мы отметили, что работы, посвященные экспрессии ММР-2 в пограничных опухолях яичника свидетельствуют об усилении реакции в микроинвазивных ПОЯ. В то же время литературные данные, касающиеся изучения ММР-2 в серозной карциноме яичника весьма противоречивы: одни исследования говорят о том, что экспрессия ММР-2 в опухолевых клетках является индикатором благоприятного прогноза при раке яичников, другие – о том, что экспрессия ММР-2 связана с плохой выживаемостью [164, 205].

Принимая во внимание противоречивость данных литературы и собственных результатов, мы считаем, что необходимо продолжить изучение экспрессии ММР-2 в пограничных опухолях яичника и его прогностической значимости на большем числе наблюдений.

Изучение экспрессии ММР-9 в пограничных опухолях яичника показало ее значимое усиление в опухолях без рецидивов и снижение в рецидивных опухолях ($p = 0,003$, критерий Манна-Уитни), хотя по данным литературы для агрессивного фенотипа должно быть характерно усиление реакции.

Возможно, в нашей серии наблюдений синтез ММР-9 в определенной степени регулировался действием ингибиторов матриксных протеиназ, что подтверждается результатами изучения экспрессии TIMP-2.

Члены семейства тканевых ингибиторов металлопротеиназ

(TIMP), как считается, ассоциированы с прогрессией рака яичников. Так, по данным литературы экспрессия TIMP-1 ассоциирована с плохим прогнозом и агрессивным течением серозного рака яичников [122, 167].

В нашем исследовании, в пограничных опухолях яичника наиболее часто встречалось отсутствие либо слабая экспрессия TIMP-1 (36,6% и 40,7% соответственно), при этом в аденокарциномах чаще выявлялось умеренное и выраженное окрашивание (42,9% и 19,1% соответственно). Статистические различия оказались значимыми ($p < 0,0001$, критерий Манна-Уитни). Этот факт, вероятнее всего, связан с низким злокачественным потенциалом ПОЯ и, в определенной степени, подтверждает данные литературы о неблагоприятном прогностическом значении этого ингибитора.

Экспрессия TIMP-1 значимо не различалась в зависимости от отсутствия или наличия рецидива ПОЯ ($p > 0,05$; критерий Манна-Уитни).

Имеются сообщения о том, что экспрессия TIMP-2 значительно выше в карциномах яичника по сравнению с доброкачественными и пограничными опухолями [122]. При анализе реакции TIMP-2 мы обнаружили отсутствие экспрессии данного маркера в ПОЯ без рецидивов, а так же слабое и умеренное окрашивание в рецидивных опухолях. Возможно, это обусловлено тем, что в рецидивных пограничных опухолях увеличивается агрессивный потенциал, за который, отчасти, отвечают ингибиторы матриксных протеиназ.

BRAF – это протоонкоген, который играет важную роль в регуляции MAP kinase/ ERKs сигнального пути, влияющего на пролиферацию и дифференцировку клеток. Известно, что *BRAF* мутации являются характерными для СПОЯ и чаще встречаются

при их прогрессии [141, 186].

Однако, в нашем исследовании не выявлено связи между наличием мутации p.V600E в 15 экзоне гена *BRAF* и развитием рецидивов ПОЯ. Так же мы не выявили различий между наличием данной генетической аномалии в ПОЯ и высокодифференцированных серозных аденокарциномах.

Отсутствие различий во встречаемости мутации гена *BRAF* подтверждает теорию о двойственном пути канцерогенеза рака яичников, согласно которой у пограничных опухолей яичника и low-grade карцином имеются общие генетические аномалии, а именно мутации в генах *KRAS* и *BRAF*, в то время как для high-grade карцином характерными являются мутации гена *TP53* [82, 141, 153].

В связи с этим, мы считаем нецелесообразным определение мутации гена *BRAF* для прогнозирования рецидивов ПОЯ.

Таким образом, в пограничных опухолях, склонных к рецидивам отмечается:

- наличие имплантов (вероятность развития рецидива – 51,9%);
- наличие микрососочковой архитектуры (вероятность развития рецидива – 99,9%);
- многочисленные псаммомные тельца (вероятность развития рецидива – 30%);
- экспрессия Вах более 80%;
- выраженная экспрессия бета-катенина (+++);
- выраженная экспрессия MMP-1 (+++);
- отсутствие экспрессии MMP-9;
- слабая и умеренная экспрессия TIMP-2.

Для пограничных опухолей яичника, не склонных к реци-

дивам характерно:

- экспрессия Вах менее 50%;
- выраженная экспрессия ММР-9 (+++).

Ki-67, bcl-2, cyclin D1, сурвивин и TIMP-1 не имеют прогностического значения для планирования рецидива пограничной опухоли, однако могут оказать значительную помощь в дифференциальной диагностике между ПОЯ и высокодифференцированной серозной аденокарциномой на ее фоне.

Для дифференциального диагноза между пограничной опухолью и высокодифференцированной серозной аденокарциномой на фоне ПОЯ следует учитывать:

- экспрессию Ki-67 более 20% в аденокарциномах;
- низкую экспрессию (менее 3%) bcl-2 в ПОЯ, в аденокарциномах - более 15%;
- наличие в ПОЯ экспрессии Вах менее 90%, в аденокарциномах - 90% и более;
- наличие в ПОЯ экспрессии циклина D1 менее 30%, в аденокарциномах - более 60%;
- высокий уровень экспрессии сурвивина в аденокарциномах (более 70%);
- в пограничных опухолях – отсутствие, либо слабая экспрессия TIMP-1, в аденокарциномах – умеренная и выраженная реакция.

Прогностическое значение экспрессии маркеров ММР-2, p21 и p53 в пограничных опухолях яичника требует дальнейшего изучения.

Мутация p.V600E 15 экзона гена *BRAF* не является фактором риска рецидива ПОЯ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного комплексного морфологического исследования подтвердилось неблагоприятное течение серозных пограничных опухолей яичника с наличием неинвазивных имплантов; вероятность развития рецидива таких опухолей составила 51,9% ($p < 0,0001$).

Инвазивные импланты при типичной СПО имели морфологические признаки low-grade серозной аденокарциномы, а при дорезке блоков первичного очага нами были выявлены скрытые микроочаги инвазивной карциномы в строме ПОЯ.

Так же доказано прогностическое значение псаммомных телец в опухолях. Их наличие значимо чаще встречалось в рецидивных опухолях, а риск развития рецидива при выявлении псаммомных телец составил 30% ($p = 0,049$).

Такая морфологическая особенность СПО как формирование микрососочков обнаружена нами исключительно в рецидивных ПОЯ, и риск развития рецидива микропапиллярной пограничной опухоли составил 99,9% ($p < 0,0001$).

Применение иммуногистохимических методов позволило определить молекулярно-биологические факторы, влияющие на прогноз заболевания.

Так, для ПОЯ склонных к рецидивам отмечается экспрессия Вах, более чем в 80% опухолевых клеток, коррелирующая с выраженной (+++) экспрессией ММР-1 ($p = 0,043$; $p = 0,024$; коэфф. Спирмена = 0,23; $p = 0,045$). Неблагоприятным прогностическим фактором оказалась и гиперэкспрессия (+++) бета-катенина ($p = 0,0001$). Усиление экспрессии Вах и бета-катенина так же отмечено при переходе опухоли от I ко II стадии опухолевого процесса ($p = 0,05$; $p = 0,041$). Слабая (+) и умеренная (++) экспрес-

сия TIMP-2 так же была характерна для рецидивных ПОЯ ($p=0,03$). Между тем, гиперэкспрессия (+++) MMP-9 оказалась благоприятным прогностическим фактором ($p=0,003$).

Помимо факторов биологической агрессивности, нами выявлен спектр маркеров, помогающих в дифференциальной диагностике ПОЯ и low-grade серозных аденокарцином, развивающихся на их фоне.

Так для аденокарцином значимым оказался уровень экспрессии Ki-67, в более чем 20% клеток опухоли ($p=0,021$), bcl-2 - более 15% ($p=0,004$), Вах – более 90% ($p=0,004$), циклина D1 – более 60% ($p=0,014$), а сурвивина – более 70% ($p=0,002$). Также выявлена умеренная (++) и выраженная (+++) экспрессия TIMP-1 ($p < 0,0001$).

В то же время для пограничных опухолей экспрессия bcl-2 была значимо меньше 3% ($p=0,004$), Вах – менее 90% ($p=0,004$), циклина D1 – менее 30% ($p=0,014$), отсутствие экспрессии TIMP-1 ($p < 0,0001$).

При генетическом анализе не было выявлено различий по частоте встречаемости мутации p.V600E 15 экзона гена BRAF ни в исследуемых группах ПОЯ, ни в группе сравнения ($p>0,05$).

ВЫВОДЫ

1. Наличие микрососочковой архитектуры в пограничной опухоли яичника свидетельствует о ее повышенной биологической агрессивности (риск развития рецидива – 99,9%).

Выявление множественных псаммомных телец в серозной пограничной опухоли связано с неблагоприятным прогнозом (риск развития рецидива – 30%).

2. Наличие неинвазивных имплантов значительно повышает риск рецидива пограничной опухоли яичника (до 51,9%).

3. Инвазивные импланты при серозной пограничной опухоли характеризуются морфологическими признаками высокодифференцированной аденокарциномы (клеточная атипия, повышения ядерной градации), и вероятнее всего, свидетельствует о невыявленных микроочагах аденокарциномы в первичной опухоли.

4. Гиперэкспрессия индуктора апоптоза Вах, регулятора wnt-пути бета-катенина и металлопротеиназы MMP-1 в сочетании со слабой и умеренной экспрессией ингибитора металлопротеиназ TIMP-2 коррелирует с рецидивирующим течением пограничных опухолей яичников.

Выраженная экспрессия металлопротеиназы MMP-9 связана с безрецидивным течением пограничных опухолей яичников.

При переходе от I к II клинической стадии пограничных опухолей яичников отмечается усиление экспрессии Вах и бета-катенина, что следует учитывать в клинической практике.

5. Высокодифференцированные серозные аденокарциномы отличаются от серозных пограничных опухолей экспрессией маркеров пролиферации Ki-67 и cyclin D1 более 20% и 60% клеток, соответственно; ингибиторов апоптоза bcl-2 и сурвивина –

более 15% и 70%, соответственно; индуктора апоптоза *Bax* – 90% и более, а так же умеренной и выраженной реакцией ингибитора металлопротеиназ *TIMP-1*.

6. Наличие мутации *p.V600E* в 15 экзоне гена *BRAF* не является фактором риска рецидива пограничных опухолей яичников. Вместе с тем, сходный характер мутаций *p.V600E* в 15 экзоне гена *BRAF* в пограничных опухолях яичников и аденокарциномах может служить свидетельством многоступенчатого развития опухоли.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Морфологическое заключение при пограничной опухоли яичника должно содержать:

- гистологический вариант опухоли;
- наличие микрососочковой архитектуры;
- наличие псаммомных телец;
- наличие имплантов и их подтип.

При обнаружении микрососочковой архитектуры правомерно употребление термина «неинвазивная low-grade серозная карцинома», а при морфологическом кодировании (ICD-O) после дробы необходимо указать цифру 2 (карцинома *in situ*).

При обнаружении инвазивных имплантов в типичной СПО следует предпринять дорезку блоков и архивного материала с целью тщательного исследования первичной опухоли (1 блок/1см³) для поиска невыявленных очагов высокодифференцированной аденокарциномы.

• Иммуногистохимическая панель для определения биологического потенциала ПОЯ должна включать: *Bax*, *бета-катенин*, *MMP-1*, *MMP-9*, *TIMP-2*.

- Для дифференциальной диагностики СПО и высокодифференцированной серозной аденокарциномы: *Ki-67, bcl-2, Вах, циклин D1, сурвивин, TIMP-1*.

- Усиленная коэкспрессия Вах и бета-катенина требует дополнительного обследования пациентки для уточнения стадии процесса.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агеенко, А.И. Новая диагностика рака [Текст] / А.И. Агеенко. - М., 2004.- С.21-37.
2. Агеенко, А.И. Новая общая теория канцерогенеза и на ее основе универсальный метод диагностики злокачественных опухолей [Текст] / А.И. Агеенко, И.Е. Бахлаев, В.С. Ерхов // Проблемы биомедицины на рубеже XXI века / РАЕН.- М.,2000.- С.31-34.
3. Апоптоз в гормонально-зависимых тканях и репродуктивной системе [Текст] / Г.Т. Сухих [и др.] // Акушерство и гинекология.- 1999.- №5.- С.12-15.
4. Белохвостов, А.С. Онкомаркеры [Текст] / А.С. Белохвостов, А.Г. Румянцев.- М.,2002.- С.84.
5. Биомолекулярные маркеры как факторы прогноза при серозных опухолях яичников у женщин [Текст] / Н.Б. Репина [и др.] // Тез. докл. VIII Рос. онкол. конгр.- М., 2004.-С.237.
6. Бохман, Я.В. Руководство по онкогинекологии [Текст] / Я.В. Бохман. – СПб., 2002. – 542 с.
7. Введение в молекулярную диагностику в 2 томах. Т.1 [Текст] / под ред. акад. РАН и РАМН М.А. Пальцева. - М.:ОАО "Медицина", 2010. – С.368.
8. Владимирская, Е.Б. Апоптоз и его роль в развитии опухолевого роста [Текст] / Е.Б. Владимирская, А.А. Масчан, А.Г. Румянцев // Гематология и трансфузиология. - 1997. - №5.- С.4-10.
9. Галицкий, В.А. Канцерогенез и механизмы внутриклеточной передачи сигналов [Текст] / В.А. Галицкий // Вопросы онкологии.- 2003. - №3.- С.284.
10. Гольберг, З.В. Морфология рака [Текст] / З.В. Голь-

берг, Т.А. Лавинкова // Ранняя онкологическая патология / под ред. Б.Е. Петерсона.- М., 1985.- С.56-70.

11. Губина, О.В. Особенности клинического течения и лечения пограничных опухолей яичников [Текст]: автореф. дис...канд. мед. наук / О.В. Губина. - М., 1995.

12. Гуревич, Л.Е. Иммуногистохимическое исследование фенотипа и инвазивного потенциала опухолей поджелудочной железы [Текст]: автореф. дис... д-ра биол. наук / Л.Е. Гуревич. – М., 2003.- С.5.

13. Иммуногистохимическая диагностика опухолей человека [Текст] / под ред. Н.Т. Райхлина, С.В. Петрова.- Казань, 2004.- С.65.

14. Имянитов, Е.Н. Молекулярная генетика опухолей человека [Текст] / Е.Н. Имянитов, К.П. Хансон // Рос. онкол. журн. - 1998. - №5.- С.47-51.

15. Ингибитор апоптоза сурвивин при переходноклеточном раке мочевого пузыря [Текст] / О.М. Вольпина [и др.] // Архив патологии.- 2011.- №2.- С.8-10.

16. Лушников, Е.Ф. Гибель клетки (апоптоз) [Текст] / Е.Ф. Лушников, А.Ю. Абросимов.- М., 2001.- С.173-175.

17. Металлопротеиназы матрикса нормальных тканей человека [Текст] / П.З. Хасигов [и др.] // Биохимия.- 2001.- Вып.2.- С.167-179.

18. Многоликий p53: разнообразие форм, функций, опухольтесупрессирующих и онкогенных активностей [Текст] / Б.П. Копнин [и др.] // Клинич. онкогематология. – 2008. – Т.1, №1. – С.2-9.

19. Мушкамбаров, Н.Н. Молекулярная биология [Текст] / Н.Н. Мушкамбаров, С.Л. Кузнецов.- М.: МИА, 2003.- 544 с.

20. Новиков, В.С. Программированная клеточная гибель

[Текст] / В.С. Новиков. - СПб., 1996.- С.111.

21. Новикова, Е.Г. Пограничные опухоли яичников [Текст] / Е.Г. Новикова, Г.Ю. Баталова. – М., 2007. – 159 с.

22. Пожарийский, К.М. Значение иммуногистохимических методик для определения характера лечения и прогноза опухолевых заболеваний [Текст] / К.М. Пожарийский, Е.Е. Леенман // Арх. патологии. - 2000. - №5. – С.3-11.

23. Полушкина, И.Н. Биомолекулярные маркеры как факторы прогноза при серозном раке яичников III-IV стадии [Текст]: автореф. дис. ... канд. мед. наук / И.Н. Полушкина.- М., 2002.- С.4-5.

24. Протеомика – новое направление в изучении опухолевых маркеров при раке яичников [Текст] / А.И. Арчаков [и др.] // Акушерство и гинекология. - 2003.- №6.- С.9-10.

25. Райхлин, Н.Т. Регуляция и проявления апоптоза в физиологических условиях и в опухолях [Текст] / Н.Т. Райхлин, А.Н. Райхлин // Вопр. онкологии.- 2002.- №4.- С.166.

26. Роль металлопротеиназ матрикса и их ингибиторов в процессах опухолевой инвазии и метастазировании [Текст] / П.З. Хасигов [и др.] // Биохимия.- 2003.- Вып.7. –С.869-876.

27. Ронина, Е.А. Лечение и медико-социальная реабилитация больных злокачественными опухолями яичников I стадии [Текст]: автореф. дис...канд. мед. наук / Е.А. Ронина. - М., 1997.

28. Хансон, К.П. Молекулярная генетика рака яичников [Текст] / К.П. Хансон, Е.Н. Имянитов // Практич. онкология.- 2000.- №4.- С.3-6.

29. Чернобыльский, Б.В. Иммуногистохимическая диагностика опухолей яичников: руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека [Текст] / Б.В. Чернобыльский; под ред. С.В. Петрова, Н.Т. Райхлина.- Казань, 2004.-

Гл.12.- С.125-132.

30. 20q13 and cyclin D1 in ovarian carcinomas: analysis by fluorescence in situ hybridization [Text] / J. Diebold [et al.] // J Pathol.- 2000.- Vol.190. – P.564-571.

31. 72-kilodalton type IV collagenase, type IV collagen, and Ki67 antigen in serous tumors of the ovary: a clinicopathologic, immunohistochemical, and serological study [Text] / M. De Nictolis [et al.] // Int. J. Gynecol. Pathol.- 1999.- Vol. 15. – P.102-109.

32. A comparative analysis of 57 serous borderline tumors with and without a noninvasive micropapillary component [Text] / B.M. Slomovitz [et al.] // Am J Surg Pathol.- 2002.- Vol. 26. – P.592-600.

33. A nationwide study of serous "borderline" ovarian tumors in Denmark 1978-2002: centralized pathology review and overall survival compared with the general population [Text] / [C.G. Hannibal](#) [et al.] // [Gynecol Oncol](#).- 2014.- Vol. 134, № 2. – P.267-273.

34. A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene [Text] / T. Motokura [et al.] // Nature.- 1991.- Vol. 350. – P.512-515.

35. A population-based study of BRCA1 and BRCA2 mutations in Jewish women with epithelial ovarian cancer [Text] / K. Lu [et al.] // Obstet Gynecol. – 1999. – Vol.93. – P.34-37.

36. Abo-Elwafa, H.A. The prognostic value of p53 mutation in pediatric marrow hypoplasia [Text] / H.A. Abo-Elwafa, F.M. Attia, A.E.A. Sharaf // Diagn Pathol.- 2011. – Vol. 6. – P.58.

37. Acs, G. Serous and mucinous borderline (low malignant potential) tumors of the ovary [Text] / G. Acs // Am. J. Clin. Pathol. – 2005. – Vol.123 (Suppl.). – P.13-57.

38. Advanced-stage serous borderline tumors of the ovary: a clinicopathological study of 49 cases [Text] / C.B. Gilks [et al.] //

Int J Gynecol Pathol.- 2003.- Vol. 22. – P.29-36.

39. Augmented expression of metallothionein and glutathione S-transferase pi as unfavorable prognostic factors in cisplatin-treated ovarian cancer patients [Text] / P. Surowiak [et al.] // Virchows Arch.- 2005.- Vol. 447. – P.626–633.

40. Bax protein expression and clinical outcome in epithelial ovarian cancer [Text] / Y.T. Tai [et al.] // J Clin Oncol.- 1998.- Vol.16. – P.2583–2590.

41. BCL-2 is consistently expressed in hyperplastic marginal zones of the spleen, abdominal lymph nodes, and ileal lymphoid tissue [Text] / B.A. Meda [et al.] // Am J Surg Pathol.- 2003.- Vol.27,№ 7. – P.888-894.

42. Bcl-2 protein expression is associated with a prognostically favourable phenotype in breast cancer irrespective of p53 immunostaining [Text] / L. Nakopoulou [et al.] // Histopathology.- 1999.- Vol.34. – P.310-319.

43. Bcl-2 vs p53 protein expression, apoptosis, and p53 mutation in human epithelial ovarian cancers [Text] / W.Y. Chan [et al.] // Am J Pathol.- 2000.- Vol.156. – P.409–417.

44. Behavior of borderline tumors with particular interest to persistence, recurrence, and progression to invasive carcinoma: a prospective study [Text] / G. Zanetta [et al.] // J. Clin. Oncol. – 2001. – Vol.19. – P.2658-2664.

45. Bell, D.A. Benign and borderline clear cell adenofibromas of the ovary [Text] / D.A. Bell, R.E. Scully // Cancer.- 1985.- Vol. 56. – P.2922-2931.

46. Bell, D.A. Ovarian serous borderline tumors with stromal microinvasion: a report of 21 cases [Text] / D.A. Bell, R.E. Scully // Hum Pathol.- 1990.- Vol. 21. – P.397-403.

47. Bell, D.A. Peritoneal implants of ovarian serous border-

line tumors. Histologic features and prognosis [Text] / D.A. Bell, M.A. Weinstock, R.E. Scully // Cancer.- 1988.- Vol.62. – P.2212-2222.

48. Bell, D.A. Refined diagnostic criteria for implants associated with ovarian atypical proliferative serous tumors (borderline) and micropapillary serous carcinomas [Text] / D.A. Bell, A.E. Smith Sehdev, R.J. Kurman // Am J Surg Pathol.- 2001.- Vol.25. – P.419-432.

49. Benign, borderline and well-differentiated malignant intestinal mucinous tumors of the ovary: a clinicopathologic, histochemical, immunohistochemical and nuclear quantitative study of 57 cases [Text] / M. De Nictolis [et al.] // Int J Gynecol Pathol.- 1994.- Vol. 13. – P.10-21.

50. Borderline ovarian tumors in Sweden 1960-2005: trends in incidence and age at diagnosis compared to ovarian cancer [Text] / I. Skirnisdottir [et al.] // Int. J. Cancer. –2008 - Vol.123,№ 8. – P.1897-1901.

51. Borderline tumors of the ovary: clinical course and prognostic factors [Text] / N.L. Ewald-Riegler [et al.] // Onkologie.- 2012.- Vol.35,№ 1-2. – P.28-33.

52. Bracke, M.E. The E-cadherin/catenin complex in invasion and metastasis [Text] / M.E. Bracke, F.M. Van Roy, M.M. Mareel // Curr Top Microbiol Immunol.- 1996.- Vol.213(Pt 1). – P.123-161.

53. B-raf and a B-raf pseudogene are located on 7q in man [Text] / G. Sithanandam [et al.] // Oncogene.- 1992.- Vol.7,№4. – P. 795–799.

54. BRAF mutation in papillary thyroid cancer and its value in tailoring initial treatment: a systematic review and meta-analysis [Text] / R.P. Tufano [et al.] // Medicine (Baltimore).- 2012.- Vol.91.- P.274–286.

55. BRAF mutation occurs in a majority of papillary thyroid carcinoma [Text] / Y. Cohen [et al.] // J Natl Cancer Inst.- 2003.- Vol.95,№ 8.- P. 625-627.

56. Bramhall, S.R. The matrix metalloproteinases and their inhibitors in the pancreatic cancer [Text] / S.R. Bramhall // Int. J. Pancreatol. - 1997. –Vol.21. –P.1-12.

57. Brustmann, H. Immunohistochemical detection of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) and c-kit in serous ovarian carcinoma: A clinicopathologic study [Text] / H. Brustmann // Gynecol Oncol.- 2005.- Vol.98. – P.396–402.

58. Burks, R.T. Micropapillary serous carcinoma of the ovary. A distinctive low-grade carcinoma related to serous borderline tumors [Text] / R.T. Burks, M.E. Sherman, R.J. Kurman // Am J Surg Pathol.- 1996.- Vol. 20. – P.1319-1330.

59. Characterization of gelatinases linked to extracellular matrix invasion in ovarian adenocarcinoma: purification of matrix metalloproteinase 2 [Text] / T.N. Young [et al.] // Gynecol. Oncol.- 1996.- Vol. 62. – P. 89-99.

60. Clinical management of borderline ovarian tumors [Text] / F. Trillsch [et al.] // Expert Rev. Anticancer Ther. – 2010. – Vol.10,№ 7. – P. 1115-1124.

61. Clinical significance of microinvasion in borderline ovarian tumors and its impact on surgical management [Text] / A. Ferrero [et al.] // Int J Gynecol Cancer.- 2012.- Vol. 22,№ 7. – P. 1158-1162.

62. Clinical significance of microinvasion in borderline ovarian tumors and its impact on surgical management [Text] / A. Ferrero [et al.] // Int J Gynecol Cancer.- 2012.- Vol.22,№ 7. – P.1158-1162.

63. Comparative immunohistochemical studies of bcl-2 and

p53 proteins in benign and malignant ovarian endometriotic cysts [Text] / F. Nezhat [et al.] // Cancer.- 2002.- Vol. 94. – P.2935–2940.

64. Comparison of cytogenetic analysis, southern analysis, and polymerase chain reaction for the detection of t(14; 18) in follicular lymphoma [Text] / D.E. Horsman [et al.] // Am J Clin Pathol.- 1995.- Vol.103. – P.472-478.

65. Comparison of mutations of Ki-ras and p53 immunoreactivity in borderline and malignant epithelial ovarian tumors [Text] / R.F. Caduff [et al.] // Am J Surg Pathol.- 1999.- Vol. 23. – P.323-328.

66. Complete coding sequence of a human B-raf cDNA and detection of B-raf protein kinase with isozyme specific antibodies [Text] / G. Sithanandam [et al.] // Oncogene.- 1990.- Vol.5,№12. – P.1775–1780.

67. Conservative surgery for borderline ovarian tumors: a review [Text] / R. Tinelli [et al.] // Gynecol. Oncol. – 2006. – Vol. 100,№ 1. – P.185-191.

68. Conservative surgery for borderline ovarian tumors-emphasis on fertility preservation. A review [Text] / N. Koutlaki [et al.] // Chirurgia (Bucur). – 2011. – Vol.106,№ 6. – P. 715-722.

69. Cordon-Cardo, C. Mutation of cell gene regulators. Biological and clinical implications for human neoplasia [Text] / C. Cordon-Cardo // Am. J. Surg. Pathol. – 1997. – Vol.47. – P.545-560.

70. Cyclin D1 (Bcl-1, PRAD1) protein expression in low-grade B-cell lymphomas and reactive hyperplasia [Text] / W.I. Yang [et al.] // Am J Pathol.- 1994.- Vol.145. – P.86-96.

71. Cyclin D1 and retinoblastoma gene expression in human breast carcinoma: correlation with tumor proliferation and oestrogen receptor status [Text] / P. Jarňš [et al.] // J Pathol.- 1997.- Vol.182. – P.160-166.

72. Cyclin D1 expression in non-Hodgkin's lymphomas. Detection by immunohistochemistry [Text] / L.R. Zukerberg [et al.] // Am J Clin Pathol.- 1995.- Vol.103. – P.756-760.

73. Cyclin D1 expression is regulated by the retinoblastoma protein [Text] / H. Müller [et al.] // Proc Natl Acad Sci U S A.- 1994.- Vol.91. – P.2945-2949.

74. Cyclin D1 immunohistochemical staining is useful in distinguishing mantle cell lymphoma from other low-grade B-cell neoplasms in bone marrow [Text] / M.A. Vasef [et al.] // Am J Clin Pathol.- 1997.- Vol.108. – P.302-307.

75. Cyclin D1 overexpression and p53 mutation status in epithelial ovarian cancer [Text] / K. Shigemasa [et al.] // J Soc Gynecol Invest.- 1999.- Vol.6. – P.102-108.

76. Cyclin D1 protein analysis in the diagnosis of mantle cell lymphoma [Text] / C.J. de Boer [et al.] // Blood.- 1995.- Vol. 86. – P.2715-2723.

77. Demographic and genetic characteristics of patients with borderline ovarian tumors as compared to early stage invasive ovarian cancer [Text] / W. Gotlieb [et al.] // Gynecol. Oncol. – 2005. – Vol. 97. – P.780-83.

78. Diagnosis and treatment of borderline ovarian neoplasms "the state of the art" [Text] / C. Trope [et al.] // Eur. J. Gynaecol. Oncol. – 2009. – Vol.30, № 5. – P.471-482.

79. Diagnostic approach using the expression profiling of the P53 tumor suppressor gene and its related proteins in ovarian epithelial tumors [Text] / H. Lee [et al.] // Int J Gynecol Cancer.- 2005.- Vol.15, № 3. – P.453-461.

80. Diagnostic criteria and behavior of ovarian seromucinous (endocervical-type mucinous and mixed cell-type) tumors: atypical proliferative (borderline) tumors, intraepithelial, microinvasive, and

invasive carcinomas [Text] / H.W. Shappell [et al.] // Am J Surg Pathol.- 2002.- Vol. 26. – P.1529-1541.

81. Differential expression of p16/p21/p27 and cyclin D1/D3, and their relationship to cell proliferation, apoptosis and tumour progression invasive ductal carcinoma of the breast [Text] / S.C.C. Wong [et al.] // J Pathol.- 2001.- Vol.194. – P.35-42.

82. Diverse tumorigenic pathways in ovarian serous carcinoma [Text] / G. Singer [et al.] // Am J Pathol.- 2002.- Vol.160. – P.1223-1228.

83. Downward, J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy [Text] / J. Downward // Nat. Rev. Cancer.- 2003.- Vol. 3,№1. – P.11–22.

84. Epithelial ovarian tumors of low malignant potential: the role of microinvasion [Text] / B.M. Buttin [et al.] // Obstet Gynecol.- 2002.- Vol.99,№ 1. – P.11-17.

85. Evaluation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 Cip 1 in epithelial ovarian tumors of low malignant potential and adenocarcinomas [Text] / I. Vassilopoulos [et al.] // Histol. Histopathol.- 2003.- Vol.18. – P.761–770.

86. Expression and activity of MMPs and their regulators in ovarian cancer [Text] / M.S. Naylor [et al.] // Int. J. Cancer.- 1994.- Vol.58. – P.50-56.

87. Expression and clinical significance of vascular endothelial growth factor, cyclooxygenase-2, and Bcl-2 in borderline ovarian tumors [Text] / M. Li [et al.] // Arch Gynecol Obstet.- 2005.- Vol.272. – P.48–52.

88. Expression and mutational analysis of ckit in ovarian surface epithelial tumors [Text] / D.J. Kim [et al.] // J Korean Med Sci.- 2006.- Vol. 21. – P.81–85.

89. Expression and prognostic significance of cox-2 and p-53

in hodgkin lymphomas: a retrospective study [Text] / N.O. Barisik [et al.] // Diagn Pathol.- 2010.- Vol. 5. – P.19.

90. Expression levels of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 in the plasma of patients with ovarian carcinoma [Text] / L. Manenti [et al.] // Eur. J. Cancer.- 2003.- Vol.39. – P.1948–1956.

91. Expression of C-kit and platelet-derived growth factor receptors in ovarian granulose cell tumors [Text] / R.P. Rocconi [et al.] // Reprod Sci.- 2008.- Vol. 15, № 7. – P.673–677.

92. Expression of cyclin D1 and c-Ki-ras gene in human epithelial ovarian tumors [Text] / W.C. Hung [et al.] // Hum Pathol. - 1996.- Vol.27. – P.1324-1328.

93. Expression of differentiation and proliferation related proteins in epithelium of prophylactically removed ovaries from women with a hereditary female adnexal cancer predisposition [Text] / J.M. Piek [et al.] // Histopathol.- 2003.- Vol.43. – P.26–32.

94. Expression of Pro-Apoptotic (p53, p21, bax, bak and fas) and Anti-Apoptotic (bcl-2 and bcl-x) Proteins in Serous Versus Mucinous Borderline Ovarian Tumours [Text] / R. Fauvet [et al.] // J Surg Oncol.- 2005.- Vol. 92. – P.337–343.

95. Expression of the bcl-2 oncogene protein is not specific for the 14;18 chromosomal translocation [Text] / F. Pezzella [et al.] // Am J Pathol.- 1990.- Vol. 137. – P.225-232.

96. Gelatinase A-immunoreactive protein in ovarian lesions-prognostic value in epithelial ovarian cancer [Text] / A. Westerlund [et al.] // Gynecol. Oncol.- 1999.- Vol.75. – P. 91-98.

97. Giannelli, G. Induction of Cell Migration by Matrix Metalloproteinase-2 Cleavage of Laminin-5 [Text] / G. Giannelli, J. Falk-Marziller, O. Schiradi // Science. – 1997. – Vol.277. – P.225-

228.

98. Goodsell, D.S. The molecular perspective: the ras oncogene [Text] / D.S. Goodsell // Oncologist.- 1999.- Vol.4,№3. – P. 263–264.

99. Hallgrimsson, J. Borderline and malignant Brenner tumours of the ovary. A report of 15 cases [Text] / J. Hallgrimsson, R.E. Scully // Acta Pathol Microbiol Scand [A] .- 1972.- Vol.233. – P.56-66.

100. Hart, W.R. Mucinous tumors of the ovary: a review [Text] / W.R. Hart // Int J Gynecol Pathol.- 2005.- Vol. 24. – P.4-25.

101. High-resolution melting analysis as a sensitive pre-screening diagnostic tool to detect KRAS , BRAF , PIK3CA , and AKT1 mutations in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues [Text] / J.T. Ney [et al.] // Arch Pathol Lab Med.- 2012.- Vol.136,№ 9. – P. 983-992.

102. Hirohashi, S. Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancer [Text] / S. Hirohashi // Am. J. Pathol. – 1998. – Vol.153. – P. 333-339.

103. Histopathologic features of ovarian borderline tumors are not predictive of clinical outcome [Text] / S. Avril [et al.] // Gynecol Oncol.- 2012.- Vol.127,№3. – P.516-524.

104. Hoerl, H.D. Primary ovarian mucinous cystadenocarcinomas. A clinicopathologic study of 49 cases with long term follow-up [Text] / H.D. Hoerl, W.R. Hart // Am J Surg Pathol.- 1998.- Vol. 22. – P.1449-1462.

105. Hotary, K. Regulation of cell invasion and morphogenesis in a three-dimensional type 1 collagen matrix by membrane-type matrix metalloproteinases 1, 2 and 3 [Text] / K. Hotary, E. Allen, A Punhuieri // J. Cell Biol. – 2000. – Vol.149. – P. 1309-1323.

106. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67 [Text] / J. Gerdes [et al.] // Am J Pathol.- 1991.- Vol. 138. – P.867-873.

107. Immunohistochemical localization of survivin in serous tumors of the ovary. Appl. Immunohistochem [Text] / B. Tringler [et al.] // Mol. Morphol.- 2004.- Vol.12. – P.40–43.

108. Immunohistochemical profiling of benign, low malignant potential and low grade serous epithelial ovarian tumors [Text] / V. Ouellet [et al.] // BMC Cancer.- 2008.- Vol.8. – P.346–353.

109. Immunohistochemistry with apoptotic-antiapoptotic proteins (p53, p21, bax, bcl-2), c-kit, telomerase, and metallothionein as a diagnostic aid in benign, borderline, and malignant serous and mucinous ovarian tumors [Text] / H. Ozer [et al.] // Diagn Pathol.- 2012.- Vol. 7, № 1. – P.124.

110. Increased Expression of Matrix Metalloproteinases (MMP)-2, MMP-9, and the Urokinase-Type Plasminogen Activator Is Associated with Progression from Benign to Advanced Ovarian Cancer [Text] / B. Schmalfeldt [et al.] // Clin Cancer Res.- 2001.- №7. – P.2396-2404.

111. Kanwar, J.R. Survivin Signaling in Clinical Oncology: A Multifaceted Dragon [Text] / J.R. Kanwar, S.K. Kamalapuram, R.K. Kanwar // Med Res Rev.- 2013.- Vol.33, № 4.- P.765-789.

112. Kennedy, A.W. Ovarian papillary serous tumors of low malignant potential (serous borderline tumors). A long term follow-up study, including patients with microinvasion, lymph node metastasis, and transformation to invasive serous carcinoma [Text] / A.W. Kennedy, W.R. Hart // Cancer.- 1996.- Vol. 78. – P.278-286.

113. Keratins 7 and 20 as diagnostic markers of carcinomas metastatic to the ovary [Text] / C.C. Wauters [et al.] // Hum Pathol.-

1995.- Vol. 26. – P.852-855.

114. KRAS and BRAF mutations in Serbian patients with colorectal cancer [Text] / K. Jakovljevic [et al.] // J BUON.- 2012.- Vol.17,№ 3.- P.575-580.

115. Lee, K.R. Mucinous tumors of the ovary. A clinicopathologic study of 196 borderline tumors (of intestinal type) and carcinomas, including an evaluation of 11 cases with 'pseudomyxoma peritonei'[Text] / K.R. Lee, R.E. Scully // Am J Surg Pathol.- 2000.- Vol. 24. – P.1447-1464.

116. Liotta, L.A. Tumor invasion and metastasis: An imbalance of positive and negative regulation [Text] / L.A. Liotta, W.G. Stetler-Stevenson // Cancer Res. – 1991. – Vol.51 (Suppl. 2). – P.5054-5059.

117. Low rate of apoptosis and overexpression of bcl-2 in Epstein-Barr virus- associated gastric carcinoma [Text] / T. Kume [et al.] // Histopathology.- 1999.- Vol.34. – P.502-509.

118. Low-grade serous carcinomas of the ovary contain very few point mutations [Text] / [S. Jones](#) [et al.] // [J Pathol](#).- 2012.- Vol. 226,№ 3. – P.413-420.

119. Luo, Y. Growth arrest in ovarian cancer cells by hTERT inhibition short-hairpin rna targeting human telomerase reverse transcriptase induces immediate growth inhibition but not necessarily induces apoptosis in ovarian cancer cells [Text] / Y. Luo, Y. Yi, Z. Yao // Cancer Invest.- 2009.- Vol.27. – P.960–970.

120. Luo, Y. Cell cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21/Cip 1 [Text] / Y. Luo, J. Hurwitz, J. Massagué // Nature.- 1995.- Vol.375. – P.159-161.

121. Malignant phyllodes tumours of the breast display increased stromal p53 protein expression [Text] / E.K. Millar [et al.] // Histopathology.- 1999.- Vol.34. – P.491-496.

122. Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2) and -9 (MMP-9) and their Tissue Inhibitors (TIMP-1 and TIMP-2) in Differential Diagnosis Between Low Malignant Potential (LMP) and Malignant Ovarian Tumours [Text] / M. Maata [et al.] // ANTICANCER RESEARCH.- 2007.- Vol.27. – P. 2753-2758.

123. Matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression and synthetic matrix metalloproteinase-2 inhibitor binding in ovarian carcinomas and tumor cell lines [Text] / S. Afzal [et al.] // Lab. Investig. – 1996.- Vol.74. – P. 406-421.

124. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications [Text] / A.R. Nelson [et al.] // J. Clin. Oncol.- 2000.- Vol.18. – P.1135–1149.

125. McDonald, J.W. Nuclear expression of p53, p21 and cyclin D1 is increased in bronchioloalveolar carcinoma [Text] / J.W. McDonald, T.K. Pilgram // Histopathology.- 1999.- Vol.34. – P.439-446.

126. McDonnell, T.J. Importance of the Bcl-2 family in cell death regulation [Text] / T.J. McDonnell, A. Becham, M. Sarkiss // Experimental Biol. – 1996. – Vol.52. – P.1008-1017.

127. McKenney, J.K. Patterns of stromal invasion in ovarian serous tumors of low malignant potential (borderline tumors): a reevaluation of the concept of stromal microinvasion [Text] / J.K. McKenney, B.L. Balzer, T.A. Longacre // Am J Surg Pathol.- 2006.- Vol.30. – P.1209-1221.

128. Melanoma brain metastases and vemurafenib: need for further investigation [Text] / N.M. Rochet [et al.] // Mayo Clin Proc.- 2012.- Vol.87, № 10.- P.976-981.

129. Microinvasion in low malignant potential tumors of the ovary [Text] / R. Nayar [et al.] // Hum Pathol.- 1996.- Vol. 27. – P.521-527.

130. Microinvasion links ovarian serous borderline tumor and grade 1 invasive carcinoma [Text] / R. Hogg [et al.] // Gynecol Oncol.- 2007.- Vol.106. – P.44–51.

131. Micropapillary and cribriform patterns in ovarian serous tumors of low malignant potential. A study of 99 advanced stage cases [Text] / M.T. Deavers [et al.] // Am J Surg Pathol.- 2002.- Vol. 26. – P.1129-1141.

132. Micropapillary serous carcinoma of the ovary has distinct patterns of chromosomal imbalances by comparative genomic hybridization compared with atypical proliferative serous tumors and serous carcinomas [Text] / A. Staebler [et al.] // Hum Pathol.- 2002.- Vol. 33. – P.47-59.

133. Micropapillary serous carcinoma of the ovary: an immunohistochemical and mutational analysis of p53 [Text] / H. Katabuchi [et al.] // Int J Gynecol Pathol.- 1998.- Vol.17. – P.54-60.

134. Miettinen, M. Keratin 20: immunohistochemical marker for gastrointestinal, urothelial, and Merkel cell carcinomas [Text] / M. Miettinen // Mod Pathol.- 1995.- Vol. 8. – P.384-388.

135. Miles, P.A. Proliferative and malignant Brenner tumors of the ovary [Text] / P.A. Miles, H.J. Norris // Cancer.- 1972.- Vol.30. – P.174-186.

136. Mishina, T. Cyclin D1 expression in non-small-cell lung cancers: its association with altered p53 expression, cell proliferation and clinical outcome [Text] / T. Mishina, H. Dosaka-Akita, I. Kinoshita // Br J Cancer.- 1999.- Vol.80. – P.1289-1295.

137. Miyamoto, Y. Immunohistochemical analysis of bcl-2, BAX, bcl-x and mcl-1 expression in pancreatic cancers [Text] / Y. Miyamoto, R.H.M. Wada, J.U. Lee // Oncology. – 1999. – Vol.56. – P.73-82.

138. Molecular analysis of the t (14;18) chromosomal translo-

cation in malignant lymphomas [Text] / L.M. Weiss [et al.] // N Engl J Med.- 1987.- Vol. 317. – P.1185-1189.

139. Mr 92,000 gelatinase release correlates with the metastatic phenotype in transformed rat embryo cells [Text] / E.J. Bernhard [et al.] // Cancer Res.- 1990.- Vol.50. – P. 3872–3877.

140. Mucinous ovarian tumors of Mullerian-type: an analysis of 17 cases including borderline tumors and intraepithelial, microinvasive, and invasive carcinomas [Text] / V. Dubň [et al.] // Int J Gynecol Pathol.- 2005.- Vol. 24. – P.138-146.

141. Mutations in BRAF and KRAS characterize the development of low-grade ovarian serous carcinoma [Text] / G. Singer [et al.] // J. Natl. Cancer Inst.- 2003.- Vol. 95. – P.484–486.

142. Mutations of BRAF and RAS precede the development of ovarian serous borderline tumors [Text] / C.L. Ho [et al.] // Cancer Res.- 2004.- Vol. 64. – P.6915-6918.

143. Mutations of the BRAF gene in human cancer [Text] / H. Davies [et al.] // Nature.- 2002.- Vol. 417. – P.949–954.

144. Nagase, H. Matrix metalloproteinases [Text] / H. Nagase, J.F. Woessner, Jr. // J. Biol. Chem. - 1999.- Vol.274. – P. 21491-21494.

145. Ovarian atypical proliferative (borderline) mucinous tumors: gastrointestinal and seromucinous (endocervical-like) types are immunophenotypically distinctive [Text] / R.Vang [et al.] // Int J Gynecol Pathol.- 2006.- Vol. 25. – P.83-89.

146. Ovarian mucinous tumors of low malignant potential: a clinicopathologic study of 54 tumors of intestinal and müllerian type [Text] / S. Siriaunkgul [et al.] // Int J Gynecol Pathol.- 1995.- Vol.14. – P.198-208.

147. Ovarian serous borderline tumors with invasive peritoneal implants [Text] / D.M. Gershenson [et al.] // Cancer.- 1998.- Vol.

82. – P.1096-1103.

148. Ovarian serous borderline tumors with micropapillary and cribriform patterns: a study of 40 cases and comparison with 44 cases without these patterns [Text] / J.H. Eichhorn [et al.] // Am J Surg Pathol.- 1999.- Vol. 23. – P.397-409.

149. Ovarian serous tumors of low malignant potential (borderline tumors). Outcome-based study of 276 patients with long-term (≥ 5 -year) follow-up [Text] / T.A. Longacre [et al.] // Am J Surg Pathol.- 2005.- Vol. 29. – P.707-723.

150. p53 expression in non-Hodgkin's lymphomas: a marker of p53 inactivation? [Text] / M.A. Piris [et al.] // Leuk Lymphoma.- 1995.- Vol.17. – P.35-42.

151. p53 expression in ovarian cancers: correlation with overall survival [Text] / W.H. Wen [et al.] // Int J Gynecol Pathol.- 1999.- Vol.18. – P.29-41.

152. p53 mutation and expression in lymphoma [Text] / D.J. Adamson [et al.] // Br J. Cancer.- 1995. – Vol. 72. – P.150-154.

153. Patterns of p53 mutations separate ovarian serous borderline tumors and low- and high-grade carcinomas and provide support for a new model of ovarian carcinogenesis: a mutational analysis with immunohistochemical correlation [Text] / G. Singer [et al.] // Am J Surg Pathol.- 2005.- Vol. 29. – P.218-224.

154. Peritoneal epithelial lesions associated with proliferative serous tumors of ovary [Text] / W.T.E. McCaughey [et al.] // Histo-pathology.- 1984.- Vol.8. – P.195-208.

155. Peyssonnaud, C. The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation [Text] / C. Peyssonnaud, A. Eyche // Biol. Cell.- 2001.- Vol. 93. – P.53–62.

156. Polakis, M. More than one way to skin a catenin [Text] / M. Polakis // Cell.- 2001.- Vol.105. – P.563–566.

157. PRAD1, a candidate BCL1 oncogene: mapping and expression in centrocytic lymphoma [Text] / C.L. Rosenberg [et al.] // Proc Natl Acad Sci U S A.- 1991.- Vol. 88. – P.9638-9642.

158. Prat, J. Ovarian tumors of borderline malignancy (tumors of low malignant potential): a critical appraisal [Text] / J. Prat // Adv Anat Pathol.- 1999.- Vol. 6. – P.247-274.

159. Prat, J. Serous borderline tumors of the ovary. A long-term follow-up study of 137 cases, including 18 with micropapillary pattern and 20 with microinvasion [Text] / J. Prat, M. de Nictolis // Am J Surg Pathol.- 2002.- Vol. 26. – P.1111-1128.

160. Production of extracellular matrix-degrading proteinases by primary cultures of human epithelial ovarian carcinoma cells [Text] / D.A. Fishman [et al.] // Cancer (Phila.).- 1997.- Vol.80. – P.1457-1463.

161. Prognostic factors for patients with advanced stage serous borderline tumours of the ovary [Text] / P. Morice [et al.] // Ann Oncol. – 2003. – Vol.14. – P.592-598.

162. Prognostic prediction of BRAF(V600E) and its relationship with sodium iodide symporter in classic variant of papillary thyroid carcinomas [Text] / W.L. Gao [et al.] // Clin Lab.- 2012. - Vol.58, № 9-10.- P.919-926.

163. Prognostic significance of cyclin D1 gene (CCND1) polymorphism in epithelial ovarian cancer [Text] / K.K. Dhar [et al.] // Int J Gynecol Cancer.- 1999.- Vol.9. – P.342-347.

164. Prognostic significance of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in epithelial ovarian cancer [Text] / S. Sillanpaa [et al.] // Gynecol. Oncol.- 2007.- Vol.104, № 2.- P. 296-303.

165. Prognostic value of lymph node involvement in ovarian serous borderline tumors [Text] / B. Lesieur [et al.] // Am J Obstet Gynecol. – 2011.- Vol.204. – P. 438.

166. Quaranta, V. Cell migration through extracellular matrix: membrane-type metalloproteinases make the way [Text] / V. Quaranta // J. Cell Biol. – 2000. – Vol.149. – P.1167-1170.

167. Rauvala, M. Gelatinases and their inhibitors in ovarian tumours; TIMP-1 is a predictive as well as a prognostic factor [Text] / M. Rauvala, U. Puistola, T. Turpeenniemi-Hujanen // Gynecol Oncol.- 2005.- Vol.99. – P. 656-663.

168. Reduced expression of BAX is associated with poor prognosis in patients with epithelial ovarian cancer: a multifactorial analysis of TP53, p21, BAX and BCL-2 [Text] / M. Schuyer [et al.] // Br J Cancer.- 2001.- Vol. 85,№ 9. – P.1359–1367.

169. Reed, J.C. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death [Text] / J.C. Reed // J. Cell Biol. – 1994. – Vol.124. – P.1-6.

170. Riopel, M.A. Evaluation of diagnostic criteria and behavior of ovarian intestinal-type mucinous tumors. Atypical proliferative (borderline) tumors and intraepithelial, microinvasive, invasive and metastatic carcinomas [Text] / M.A. Riopel, B.M. Ronnett, R.J. Kurman // Am J Surg Pathol.- 1999.- Vol. 23. – P.617-635.

171. Risk factors for epithelial borderline ovarian tumors: results of a Swedish case-control study [Text] / T. Riman [et al.] // Gynecol. Oncol. – 2001. – Vol.83. – P.575-585.

172. Rodriguez, I.M. Endocervical-like mucinous tumors of the ovary. A clinicopathologic analysis of 31 cases [Text] / I.M. Rodriguez, J.A. Irving, J. Prat // Am J Surg Pathol.- 2004.- Vol. 28. – P.1311-1318.

173. Rodriguez, I.M. Mucinous tumors of the ovary. A clinicopathologic analysis of 75 borderline tumors (of intestinal type) and carcinomas [Text] / I.M. Rodriguez, J. Prat // Am J Surg Pathol.- 2002.- Vol. 26. – P.139-152.

174. Role of betacatenin/ T-cell factor-regulated genes in

ovarian endometrioid adenocarcinomas [Text] / Y. Zhai [et al.] // Am. J. Pathol.- 2002.- Vol.160. – P.1229–1238.

175. Russel, P. The pathological assessment of ovarian neoplasms. II: The proliferating epithelial tumors [Text] / P. Russel // Pathology.- 1979.- Vol.11. – P.251-282.

176. Rutgers, J.L. Ovarian müllerian mucinous papillary cystadenomas of borderline malignancy. A clinicopathologic analysis [Text] / J.L. Rutgers, R.E. Scully // Cancer.- 1988.- Vol. 61. – P.340-348.

177. Santesson, L. General classification of ovarian tumours / L. Santesson, H.L. Kottmeir // Ovarian cancer? / eds.: F. Gentil, A.C. Junquiera.- New York: Springer-Verlag, 1968. – P.1-8.

178. Scully, R.E. Tumors of the ovary, maldeveloped gonads, fallopian tube, and broad ligament / R.E. Scully, R.H. Young, P.B. Clement // Atlas of Tumor Pathology / eds.: J. Rosai, L.H. Sobin.- 3rd ed.- Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology, 1998.- P. 23.

179. Secretion of extracellular matrix-degrading proteinases is increased in epithelial ovarian carcinoma [Text] / T.L. Moser [et al.] // Int. J. Cancer.- 1994.- Vol.56. – P.552–559.

180. Segal, G.H. Ovarian serous tumors of low malignant potential (serous borderline tumors). The relationship of exophytic surface tumor to peritoneal ‘implants’ [Text] / G.H. Segal, W.R. Hart // Am J Surg Pathol.- 1992.- Vol. 16. – P.577-583.

181. Seidman, J. Ovarian serous borderline tumours: a critical review of the literature with emphasis on prognostic indicators [Text] / J.D. Seidman, R.J. Kurman // Hum. Pathol. – 2000. – Vol.31. – P.539-557.

182. Seidman, J.D. Subclassification of serous borderline tumors of the ovary into benign and malignant types. A

clinicopathologic study of 65 advanced stage cases [Text] / J.D. Seidman, R.J. Kurman // Am J Surg Pathol.- 1996.- Vol. 20. – P.1331-1345.

183. Serous borderline (low malignant potential, atypical proliferative) ovarian tumors: workshop perspectives [Text] / D.A. Bell [et al.] // Hum Pathol.- 2004.-Vol. 35,№ 8. – P. 934-948.

184. Serous borderline tumors of the ovary with noninvasive peritoneal implants [Text] / D.M. Gershenson [et al.] // Cancer.- 1998.- Vol. 83. – P.2157-2163.

185. Serous borderline tumors of the ovary: a clinicopathologic, immunohistochemical and quantitative study of 44 cases [Text] / M. De Nictolis [et al.] // Cancer.- 1992.- Vol. 70. – P.152-160.

186. Shih, I. Molecular pathogenesis of ovarian borderline tumors: new insights and old challenges [Text] / I. Shih, R. Kurman // Clin. Cancer Res. – 2005. – Vol. 11,№ 20. – P.7273-7279.

187. Singh, N. The value of immunohistochemistry on paraffin wax embedded tissue sections in the differentiation of small lymphocytic and mantle cell lymphomas [Text] / N. Singh, D.H. Wright // J Clin Pathol.- 1997.- Vol. 50. – P.16-21.

188. Skirnisdottir, I. P53, bcl-2, and bax: Their relationship and effect on prognosis in early stage epithelial ovarian carcinoma [Text] / I. Skirnisdottir, B. Sorbe, T. Seidal // Int J Gynecol Cancer.- 2001.- Vol. 11. – P.147–158.

189. Sornsukolrat, S. Prognostic factors and survival of borderline ovarian tumors in Rajavithi Hospital between 1979-2006 A.D. [Text] / S. Sornsukolrat, S. Tuipae // J Med Assoc Thai.- 2012.- Vol.95,№ 9. – P.1141-1148.

190. Stack, M.S. The role of proteolytic enzymes in the pathology of epithelial ovarian carcinoma [Text] / M.S. Stack, S.M.

Ellerbroek, D.A. Fishman // Int. J. Oncol.- 1999.- Vol.12. – P.569–576.

191. Staunton, M.J. Tumor type is a development of susceptibility to apoptosis [Text] / M.J. Staunton, E. Gaffney // Anat. Pathol. – 1995. – Vol.103. – P.300-307.

192. Survivin - prognostic tumor biomarker in human neoplasms [Text] / J. Waligyrsk-Stachura [et al.] // Ginekol Pol.- 2012.- Vol. 83, № 7. – P.537-540.

193. Synthesis and breakdown of fibrillar collagens; concomitant phenomena in ovarian cancer [Text] / M. Santala [et al.] // Br J Cancer.- 1998.- Vol.77. – P.1825-1831.

194. Tang, D.G. Apoptosis: A current molecular analysis [Text] / D.G. Tang, AT. Porter // Oncology Research. – 1996.- Vol.2, №3. – P.117-131.

195. Taraboletti, G. Shedding of the Matrix Metalloproteinases MMP-2, MMP-9 and MT1-MMP as Membrane Vesicle-Associated Components by Endothelial Cells [Text] / G. Taraboletti, S.D' Ascerzo, P. Borsotti // Am. J. Pathol. – 2002. – Vol.160. – P.673-680.

196. Tavassoli, F.A. Serous tumor of low malignant potential with early stromal invasion (serous LMP with microinvasion) [Text] / F.A. Tavassoli // Mod Pathol.- 1988.- № 1.- P.407-413.

197. Taylor, H.C. Jr. Malignant and semimalignant tumors of the ovary [Text] / H.C. Taylor, Jr. // Surg. Gynecol. Obstet. – 1929. – Vol.48. – P.204-230.

198. The 14;18 translocation in European cases of follicular lymphoma: comparison of Southern blotting and the polymerase chain reaction [Text] / F. Pezzella [et al.] // Br J Haematol.- 1990.- Vol. 76. – P.58-64.

199. The concurrent expression of p27 (kip1) and cyclin D1 in

epithelial ovarian tumors [Text] / L. Sui [et al.] // Gynecol Oncol.- 1999.- Vol.73. – P.202-209.

200. The development of high-grade serous carcinoma from atypical proliferative (borderline) serous tumors and low-grade micropapillary serous carcinoma: a morphologic and molecular genetic analysis [Text] / R. Dehari [et al.] // Am J Surg Pathol.- 2007.- Vol.31, № 7. – P. 1007-1012.

201. The expression of p53 protein in non-Hodgkin's lymphomas is not always dependent on p53 gene mutations [Text] / R. Villuendas [et al.] // Blood.- 1993.- Vol. 82. – P.3151-3156.

202. The histologic type and stage distribution of ovarian carcinomas of surface epithelial origin [Text] / J. Seidman [et al.] // Int. J. Gynecol. Pathol. – 2004. – Vol.23, № 1. – P.41-44.

203. The positive nuclear staining observed with monoclonal antibody against PRAD1/cyclin D1 correlates with mRNA expression in mantle cell lymphoma [Text] / H. Kuroda [et al.] // Jpn J Cancer Res.- 1995.- Vol.86. – P.890-898.

204. The prognostic significance of p53 tumor suppressor gene alterations in ovarian carcinoma [Text] / M.S. Shahin [et al.] // Cancer.- 2000.- Vol.89. – P.2006-2017.

205. Tissue and serum metalloproteinase (MMP-2) expression in advanced ovarian serous cystadenocarcinomas: clinical and prognostic implications [Text] / G. Garzetti [et al.] // Anticancer Res.- 1995.- Vol.15. – P. 2799-2804.

206. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological function [Text] / D.E. Gomez [et al.] // Eur J Cell Biol.- 1997. - Vol.74. – P. 111-122.

207. Trimble, C. Long-term survival and patterns of care in women with ovarian tumors of low malignant potential [Text] / C. Trimble, C. Kosary, E. Trimble // Gynecol. Oncol. – 2002. – Vol.86.

– P.34-37.

208. Tsujimoto, Y. Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma [Text] / Y. Tsujimoto, C.M. Croce // Proc Natl Acad Sci U S A.- 1986.- Vol. 83. – P.5214-5218.

209. Tumours of the ovary and peritoneum: surface epithelial–stromal tumours [Text] / K.R. Lee [et al.] // World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs / eds.: F.A. Tavassoli, P. Devilee.- Lyon: IARC Press, 2003.- P.118.

210. Type I and type III collagen metabolites as predictors of clinical outcome in epithelial ovarian cancer [Text] / M. Santala [et al.] // Clin Cancer Res.- 1999.- Vol.5. – P.4091- 4096.

211. Usefulness of an immunohistochemical panel in paraffin-embedded tissues for the differentiation of B-cell non-Hodgkin's lymphomas of small lymphocytes [Text] / E.D. de Leon [et al.] // Mod Pathol.- 1998.- Vol. 11. – P.1046-1051.

212. Vang, R. Ovarian low-grade and high-grade serous carcinoma pathogenesis, clinicopathologic and molecular biologic features, and diagnostic problems [Text] / R. Vang, I.M. Shih, R.J. Kurman // Adv Anat Pathol.- 2009.- Vol.16. – P.267–282.

213. WAF1, a potent mediator of p53 tumor suppression [Text] / W.S. El-Deiry [et al.] // Cell.- 1993.- Vol.75. – P.817-825.

214. Walton, S.-J. Expression of retinoblastoma, p16 and cyclin D1 genes in gastric adenocarcinomas and precarcinomatous lesions [Text] / S.-J. Walton, R.M. Freakins // Pathological Society.- 2002.- Abstract 131.

215. WHO classification of tumours of female reproductive organs.- Lyon, 2014. – P.20-21.

216. Willert, K. Beta-catenin: a key mediator of Wnt signal-

ing [Text] / K. Willert, R. Nusse // Curr Opin Genet Dev.- 1998.- Vol.8. – P.95-102.

217. Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis [Text] / D.C. Lie [et al.] // Nature.- 2005.- Vol.437(7063). – P. 1370–1375.

218. Worsley, S.D. Overexpression of cyclin D1 in epithelial ovarian tumors [Text] / S.D. Worsley, B.A.J. Ponder, R.R. Davis // Gynecol Oncol.- 1997.- Vol.64. – P.189-195.

219. Yingzi, Yang. Wnt signaling in development and disease [Text] / Yang Yingzi // CELL & BIOSCIENCE.- 2012.- Vol.2,№1.- P.14.

220. Young, R.H. Mucinous tumors of the appendix associated with mucinous tumors of the ovary and pseudomyxoma peritonei. A clinicopathological analysis of 22 cases supporting an origin in the appendix [Text] / R.H. Young, C.B. Gilks, R.E. Scully // Am J Surg Pathol.- 1991.- Vol.15. – P.415-429.

221. Zeng, Z.S. Loss of basement membrane type IV is associated with increased expression of metalloproteinases 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9) during human colorectal tumorigenesis [Text] / Z.S. Zeng, A.M. Cohen, J.G. Guillem // Carcinogenesis. – 1999. – Vol.20,№5. – P.749-755.

222. Zhang, H. p21 containing cyclin kinases exist in both active and inactive states [Text] / H. Zhang, G.J. Hannon, D. Beach // Genes Dev.- 1994.- №8. – P.1750-1758.

223. Zhang, H. Proliferating cell nuclear antigen and p21 are components of multiple cell cycle kinase complexes [Text] / H. Zhang, Y. Xiong, D. Beach // Mol. Biol. Cell.- 1993.- №4. – P.897-906.