

УДК 616-006.04-076  
УКПП  
№ держреєстрації № 0118U003570  
Інв. №

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
СУМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
(СумДУ)  
40007, м. Суми, вул. Римського-Корсакова, 2  
тел. (0542) 33-35-39 факс. (0542) 33-40-58  
e-mail: info@sci.sumdu.edu.ua

ЗАТВЕРДЖУЮ  
Проректор з наукової роботи  
д-р. фіз.-мат. наук, професор

\_\_\_\_\_ Чорноус А.М.

ЗВІТ  
ПРО НАУКОВО-ДОСЛІДНУ РОБОТУ  
«ЕФЕКТИВНІСТЬ «LIQUID BIOPSY» ТА ТКАНИННОЇ БІОПСІЇ У  
ДІАГНОСТИЦІ ТА ЛІКУВАННІ ЗЛОЯКІСНИХ ПУХЛИН»

(проміжний)

Науковий керівник  
канд.мед наук, доцент

І.О. Винниченко

2019

Рукопис закінчено 30 грудня 2019 р.

Результати роботи розглянуто науковою радою СумДУ, протокол від  
26 грудня 2019 р. № 6.

## СПИСОК АВТОРІВ

Керівник НДР, Провідний науковий співробітник, канд.мед.наук	<hr/> (25.12.2019)	Винниченко І.О. (розділи 1,2,3,4,5,6)
Молодший науковий співробітник, канд.мед.наук	<hr/> (25.12.2019)	Винниченко О.І. (розділи 1,2,3,4, 5,6)
Молодший науковий співробітник, канд.мед.наук	<hr/> (25.12.2019)	Москаленко Ю.В. (розділи 1,2,3,4, 5,6)
Лаборант	<hr/> (25.12.2019)	Линдін М.С. (розділи 1,2,3,4, 5,6)
Лаборант	<hr/> (25.12.2019)	Казбан Н.В. (розділи 1,3,5)
Лаборант	<hr/> (25.12.2019)	Сікора В.В. (розділи 1,2,3,4, 5,6)
Лаборант	<hr/> (25.12.2019)	Піддубний А.М. (розділи 1,2,3,4, 5,6)
Лаборант	<hr/> (25.12.2019)	Стельмах В.С. (розділи 1,2, 3)
Лаборант	<hr/> (25.12.2019)	Гарбузова Є.А. (розділи 3,4,5)
Фахівець	<hr/> (25.12.2019)	Красько Н.А. (розділи 1,2,3)
Лаборант	<hr/> (25.12.2019)	Шарко В.В. (розділи 1,2)
Лаборант	<hr/> (25.12.2019)	Стеценко С.С. (розділи 3,4)

## РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 60 с., 11 рис., 4 табл., 66 джерел.

LIQUID BIOPSY, РАК ЛЕГЕНЬ, РАК НИРОК, РАК ПЕРЕДМІХУРОВОЇ ЗАЛОЗИ, ПЕРВИННИЙ РАК МАТКОВИХ ТРУБ, ІМУНОГІСТОХІМІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ.

Об'єкт дослідження – злоякісні пухлини основних локалізацій.

Предмет досліджень – клінічні, морфологічні, молекулярно-генетичні ознаки новоутворень.

Мета роботи – оптимізація діагностики і моніторингу перебігу злоякісних пухлин основних локалізацій на різних стадіях розвитку шляхом виявлення та ідентифікації вільноциркулюючих пухлинних нуклеїнових кислот (вцпНК) у рідинних середовищах організму та пухлинній тканині.

Для досягнення поставленої мети були визначені такі завдання:

- 1) Формування груп пацієнтів згідно дизайну дослідження;
- 2) Створення біобанку зразків пухлинної тканини, вцпНК плазми крові та різних рідин організму онкологічних хворих;
- 3) Проведення імунофенотипування зразків тканин пухлин та молекулярно-генетичне дослідження зразків біологічних рідин хворих;
- 4) Проведення порівняльного аналізу отриманих даних, оцінка їх відповідності.

Методи дослідження – гістологічні та імуногістохімічні дослідження біопсійного/аутопсійного інтактного матеріалу і пухлинної тканини легень, нирок, передміхурової залози, маткових труб, статистичні методи. Використання даних досліджень спрямоване на отримання даних про імунофенотип пухлин та рівні пухлинних нуклеїнових кислот (НК) з встановленням їх відповідності, зміну показників під час прогресування патологічних процесів, а також варіабельність трансформацій до та після лікування.

**ЗМІСТ**

Вступ-----	5
1 Особливості діагностики та лікування пухлин легень -----	9
2 Вибір лікувальної тактики при раку нирки в залежності від статусу експресії PD-L1-----	18
3 Дослідження морфологічних та імуногістохімічних особливостей передміхурової залози -----	22
4 Імуногістохімічні характеристики раку маткових труб -----	32
5 Узагальнення отриманих результатів-----	38
6 Висновки-----	51
Перелік джерел посилання-----	53

## ВСТУП

Прогресивна поширеність онкологічної захворюваності органів різноманітних локалізацій потребує значного покращення діагностичних методик з використанням малоінвазивних втручань. Саме тому, розробка методу та стандартизації показників рідинної біопсії є перспективним напрямком у медичній сфері. Враховуючи те, що результати даного дослідження можуть пролити світло на наявність, часто безсимптомних, пухлинних вражень, то необхідно чітко ідентифікувати вільно циркулюючі пухлинні ДНК та встановити особливості їх продукції в залежності від органу. Разом з цим, важливо встановити кореляційні взаємозв'язки між показниками результатів крові за допомогою «liquid biopsy» та гістологічною або імуногістохімічною диференціацією тканинної біопсії. Саме співвідношення даних показників сприятиме оптимізації таргетної терапії для пацієнта для покращення загальної виживаності та якості життя пацієнтів. Проаналізувавши особливості сучасних методів діагностики раку, автори дійшли висновку, що, незважаючи на певні вітчизняні успіхи у діагностиці неоплазії за допомогою поширених удосконалених методів комп'ютерної томографії та біопсії, необхідне впровадження зарубіжного досвіду із скринінгу, бо існуючі найсучасніші методи діагностики дозволяють розпізнати онкологічне захворювання на ранніх стадіях виникнення. Тому нами проведено ряд досліджень з встановленням особливостей певних типів раку у різних органах.

Рак легень в структурі злоякісних новоутворень дихальної системи посідає провідне місце. Особливістю його агресивності є схильність до раннього та швидкого метастазування. Хворіють переважно чоловіки вікової групи 40 – 60 років, які є теперішніми або колишніми курцями. Зазвичай пухлина починає свій ріст по типу центрального раку легені, але дуже швидко з'являються метастази в лімфатичних вузлах середостіння та віддалених органах (печінці, головному мозку, кістках скелету). Без

спеціального протипухлинного лікування медіана виживаності складає від 2 до 4 місяців [1]. На жаль, класична хіміотерапія та променева терапія не здатні забезпечити довгострокові ефекти лікування та суттєво покращити показники виживаності пацієнтів. Лікарськими засобами з низьким рівнем токсичності могли б стати PD-L блокатори, які дуже вдало зарекомендували себе у терапії недрібноклітинного раку легені. Ефект від препаратів даної групи залежить від рівня експресії PD-L рецепторів на пухлинних клітинах.

Однією з найбільш частих причин онкологічної смерті чоловіків по всьому світу є рак передміхурової залози. Так, за даними Американського товариства раку, у 2016 році в США було зареєстровано 186 890 нових випадків раку передміхурової залози та 26 120 смертей [2]. Розвиток та прогресія раку передміхурової залози тісно пов'язані з наявністю хронічного запалення, асоційованого з присутністю інтралумінальних включень (ІЛВ) – простатолітів (ПК) та амілоїдних тільцець (СА), або corpora amylacea [3]. Присутність ІЛВ також асоційована з кількістю активованих макрофагів, або CD68-позитивних клітин, розвитком хронічного больового синдрому та раку передміхурової залози [4-5]. Формування ІЛВ є комплексним процесом, що залучає взаємодію як пухлинних клітин, так і стромального компоненту неоплазії. Ремоделювання пухлинної стромы проявляється у вигляді ангиогенезу (підвищена експресія судинного ендотеліального фактору росту – VEGF) та підвищеної експресії стресових факторів, таких як білки теплового шоку (Hsp70 та Hsp90), які мають виражений пропухлинний ефект та впливають на розвиток метастатичного поширення пухлини, зокрема до кісткової тканини [6-7]. Дезорганізація сполучної тканини (завдяки підвищеній експресії матриксної металопротеїнази 1 типу –ММР1) стимулює міграцію та інвазію пухлинних клітин, що також супроводжується розвитком метастазів [8]. Прогресія раку передміхурової залози супроводжується також ростом рівня апоптозу у пухлинних клітинах (експресія протеїнів p53, Вах та Casp3) та зниженням чутливості неопластичної тканини до стероїдних

гормонів, зокрема андрогенів завдяки зниженню експресії рецепторів до цих сполук [9,10].

Перебіг та прогноз злоякісного процесу має пряму залежність від ступеню диференціювання пухлинної тканини. Для оцінки морфологічного статусу раку передміхурової залози загальноприйнятою є шкала Глісона [11]. Відомо, що зі зниженням ступеню диференціювання раку передміхурової залози погіршується прогноз захворювання та значно збільшується вірогідність метастазування, переважно з ураженням кісткової тканини [12].

Первинний рак маткових труб займає останнє місце серед пухлин жіночої репродуктивної системи, проте смертність від нього достатньо висока [13]. Література щодо цієї тематики охоплює більшою частиною окремі спостереження за невеликою кількістю хворих. Причини виникнення первинного раку маткових труб, його частота, можливості діагностики, профілактики та лікування залишаються не лише проблемними й актуальними, але й маловисвітленими в сучасній медичній літературі. Частота виникнення злоякісних новоутворень маткових труб коливається в межах від 0.14 до 1.8% серед усіх злоякісних пухлин жіночої репродуктивної системи [14–17]. При тубооваріальних пухлинах, коли важко встановити первинність початкового пухлинного процесу, злоякісні новоутворення маткових труб часто розцінюються як рак яєчників. Відповідно пухлини цієї локалізації в практичній онкогінекології трапляються значно частіше [18,19]. Саме це зумовлює значну розбіжність у публікаціях про захворюваність на первинний рак маткових труб, що насамперед, залежить від якості морфологічної діагностики.

На сьогодні відомо, що карцинома фалопієвої труби в практичній онкогінекології зустрічається значно частіше і є першоджерелом серозних та муцинозних пухлин яєчників та очеревини [20–23]. Підвищення онкологічної настороженості, вдосконалення методів діагностики та запровадження імуногістохімічних методів дослідження в практику послужили відносному

зростанню рівня захворюваності на первинний рак маткових труб упродовж останніх років [24].

Основними прогностичними критеріями до теперішнього часу є клінічна стадія захворювання та ступінь диференціювання неоплазії [25,26]. Інколи визначити значимі прогностичні фактори дуже важко. Ідентифікація пухлинних маркерів у тканині неоплазії надає важливу діагностичну і прогностичну інформацію про статус хвороби та її біологічні властивості, що впливає на лікування пацієнтів.



## 1 ОСОБЛИВОСТІ ДІАГНОСТИКИ ТА ЛІКУВАННЯ ПУХЛИН ЛЕГЕНЬ

За даними ВООЗ, до 2025 року кількість випадків захворювань на злоякісні новоутворення у світі перевищить 19 млн. на рік. Прискорення прогресу у боротьбі проти раку вимагає як збільшення національних інвестицій у дослідження цієї хвороби, так і застосування наявних знань для подолання раку серед усіх верств населення [27].

В Україні щороку виявляють більше 150 тис. і щорічно вмирають майже 90 тис. онкологічних хворих. На сьогоднішній день, Україна займає провідні позиції серед інших країн за рівнем захворюваності на рак легені, і найвищі показники відзначаються в регіонах з розвиненою металургійною і вуглевидобувною промисловістю. Осередкові утворення легень виявляються в 19-25% випадків всіх патологічних змін у легенях, при цьому 40% осередкових патологічних утворень легень виявляються злоякісними [28]. Серед периферичних утворень легень найчастіше зустрічаються периферичний рак (40-70%), туберкулома (18-78%) і доброякісні позабронхіальні пухлини легень (1-28%). Незважаючи на те, що доброякісні пухлини легень спостерігаються в 10-12 разів рідше, ніж злоякісні, вони складають близько 7-10% усіх пухлин легень і до 15-20% так званих "кулястих" утворень легень. Диференціальна діагностика кулястих утворів легень має значні складнощі, оскільки поміж них існує понад 80 різновидів [29]. Променеві методики надзвичайно важливі для діагностики та диференційної діагностики онкопатології органів дихання, при цьому обстеження має бути проведено комплексно з використанням як клінічних обстежень, так і променевих методів, а також гістологічних, цитологічних досліджень [30].

Доброякісні пухлини морфологічно відповідають зрілим пухлинам, обмежені від оточуючих тканин, інкапсульовані, їх об'єднує незмінний

розмір пухлин протягом 2 років, повільний експансивний ріст, вміст кальцію, мінімальна кількість клінічних проявів до виникнення ускладнень та відносна рідкість малігнізації доброякісних утворень легень, що визначає інші підходи до вибору тактики і методів хірургічного втручання [31].

Нами систематизовано наукові відомості про найбільш поширені доброякісні пухлини легень та зібрано банк даних утворень з гістологічним підтвердженням з 2012 по 2019 роки в Сумському клінічному онкологічному диспанері (табл. 1).

Таблиця 1 – Найпоширеніші доброякісні пухлини легень

Різнovid доброякісної пухлини	Локалізація	Джерело походження	Макроскопічний опис	Мікроскопічний опис
Аденома бронхів	великі бронхи	епітелій слизової оболонки бронхів	залозисте новоутворення рожевого або червоного кольору, розміром приблизно 2-3см.	гістологічно поділяють на нейроендокринну пухлину, мукоепідермоїдний тип, цилиндрома та комбіновані аденоми із ознаками нейроендокринних пухлин та цилиндром.
Гамартома	передні сегменти легень.	з елементів зародкової тканини: легеневої паренхіми, дистальних бронхів, хрящові, фіброзні,	пухлина складається із зародкової тканини, округленої форми, капсула відсутня, але пухлина чітко відмежована від	містить клітини залозистого епітелію, жирової, лімфоїдної, хрящової тканин, сполучнотк

		жирові й судинні структури.	оточуючих тканин.	анинні волокна, судинні елементи, скупчення остеоцитів.
Папілома	великі бронхи	епітеліальна тканина бронхів	пухлина з дольчатою поверхнею, рожево-червоного кольору, із строми, з множинними виростами, зовні покритими епітелієм.	з плоского / перехідного епітелію, з добре вираженою строною.
Фіброма	великі бронхи і периферичні ділянки легень.	мезодермальне походження	із щільної сполучної тканини, від найменшого до гігантських розмірів, вузол білястого відтінку або червоного кольору, з капсулою.	фібробласти, фиброцити і колагенові волокна.
Лейоміома	центральної або периферичної локалізації	гладкі м'язові волокна судин або стінок бронхів	мають вигляд поліпів на ніжці, або множинних вузликів, еластичної консистенції, з добре вираженою капсулою.	клітини мають веретеноподібну форму, формують пучки, що йдуть в різних напрямках.
Тератома	завжди периферичної локалізації, найчастіше - у	розвивається з ембріональних клітин.	капсульоване, кістозне утворення, містить сальні	скупчення клітин зародкових листків

	верхній долі лівої легені		маси, волосся, зуби, хрящі та ін.	
Судинні пухлини (гемангіо- ендотеліома, гемангіо- перицитома, капілярна і кавернозна гемангіоми легень, лімфангіома)	периферичної/ центральної локалізації	ендотелій судин	пухлини округлої форми рожево- червоного кольору, щільні, з капсулою.	скупчення ендотеліаль- них клітин, волокна із сполучної тканини, перицити.
Неврогенні доброякісні пухлини легень (невриноми (шваноми), нейрофібром и, хемодекто ми)	найчастіше периферичної локалізації, іноді розташовують ся одночасно в обох легенях.	з нервової тканини	округлі щільні вузли сіро- жовтого кольору з капсулою.	тяжі клітин, що переплітают ься, Шванівські елементи, клітини хеморецепт орів, сполучно- тканинні перетинки із судинами

На особливу увагу з усіх різновидів доброякісних пухлин легень заслуговує нейроендокринна пухлина легень, так як даний різновид пухлини секретує адреналін, серотонін і біологічно активні речовини, які викликають карциноїдний синдром. Основними його клінічними проявами є періодичні напади жару у голові, шиї та верхніх кінцівках, дерматози, бронхоспазм, діарея, психічні розлади. Частота нападів збільшується, коли нейроендокринна пухлина легень метастазує в органи і тканини [32-34].

З усіх пухлиноподібних уражень найбільш схожими з доброякісними пухлинами легень [33-36] за клінічними проявами, перебігом захворювання,

за застосовуваними методами діагностики і лікування є запальні псевдопухлини – плазмоклітинна гранульома, гістіоцитома, ксантома, ксантогранульома та ін. Гістіоцитома складається з гістіоцитів, фібробластів, судин, клітин Туюна. Ксантома представлена сполучнотканинними, рідше епітеліальними утвореннями, клітини яких містять холестерінестри, нейтральні жири, гематосидерин, який надає їм жовтувато-бурого кольору; мікроскопічно – заповненими жиром гістіоцитами, клітинами запалення і колагеновими волокнами. Плазмоцитарна гранульома має вигляд розростань фіброзної тканини з інфільтрацією типовими плазматичними клітинами, часто з відкладенням амілоїду, вогнищами некрозу, біомінералізації, наявністю порожнин. Розвиток плазмоцитарної гранульоми пов'язують з імунними порушеннями і розладами білкового обміну.

Цитологічний аналіз змивів під час проведення фібробронхоскопії підтверджує або виключає розвиток неопластичного процесу; відеоторакоскопія, імуногістохімічне дослідження, негативна динаміка за даними комп'ютерної томографії легень, трансторакальна біопсія пухлини і гістологічне дослідження допомагають встановити пацієнту остаточний діагноз. Трансторакальна пункційна біопсія легенів під контролем рентгенівської комп'ютерної томографії, і особливо тонкогolkова аспіраційна пункційна біопсія з маленькими голками є важливим діагностичним інструментом з низьким ступенем вірогідності розвитку ускладнень [37]. Лейоміоми легені підлягають хірургічному лікуванню, так як практично завжди спостерігається ріст пухлин з розвитком ускладнень, а також їх малігнізація. Сприятливий прогноз досягається у випадках радикальної резекції пухлини.

Зразки із злоякісними пухлинами зібрано від пацієнтів, які лікувались в Сумському обласному клінічному диспансері з 2018 року. Діагноз встановлено після проведення інструментальних і лабораторних методів дослідження. Так, з метою отримання морфологічного підтвердження діагнозу проводилась діагностична бронхоскопія з тканинною біопією. Для

уточнення діагнозу виконано імуногістохімічне дослідження з визначенням фенотипу пухлини. Важливим етапом спотереження за молекулярною поведінкою неоплазії стало визначення PD-L статусу пухлини. Так, за допомогою імуногістохімічних досліджень з антитілами проти рецептора PD-L1 визначено позитивний статус у більшості пацієнтів, що характеризувалось позитивною цитоплазматичною та мембранною реакцією у пухлинних клітинах (Рис. 1).

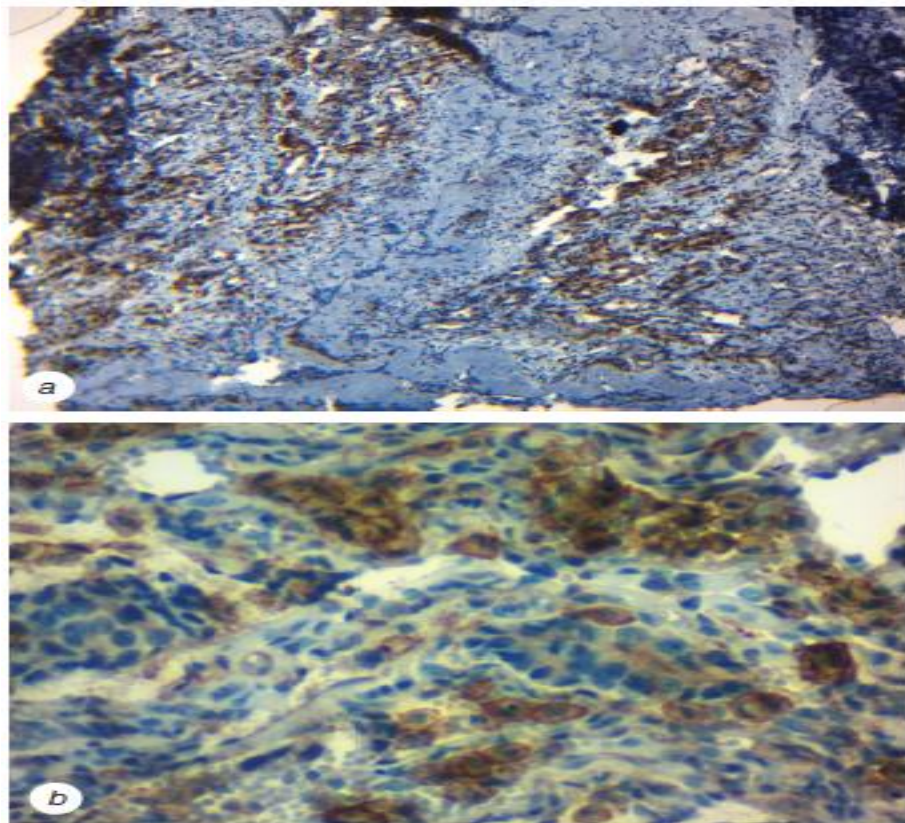


Рисунок 1 – Дрібноклітинний рак легень. Імуногістохімічна реакція з антитілами проти рецептора PD-L1, візуалізація за допомогою хромогену DAB, дофарбування ядер гематоксилином Майєра. Збільшення: *a* —  $\times 100$ , *b* —  $\times 400$ .

Отримані результати імуногістохімічних досліджень знайшли своє відображення у тактиці лікування. Так, встановлено кореляцію між підвищеною експресією ліганду PD-1 PD-L1 і кращими результатами лікування пембролізумабом у пацієнтів із запущеними стадіями недрібноклітинного раку легень. У дослідженні KEYNOTE-042 ми порівняли

результати лікування пембролізумабом в якості монотерапії та хіміотерапією на основі платини як терапії першої лінії для пацієнтів з локально розповсюдженим або метастатичним недрібноклітинним раком легені, у яких експресія PD-L1 дорівнювала 1% або перевищувала цей рівень.

### **Дизайн дослідження**

Дослідження 3 фази було проведене в 213 центрах світу, в тому числі і в Україні та Сумському клінічному онкологічному диспансері. Серед критеріїв включення пацієнтів згідно із протоколом була наявність експресії PD-L1 на рівні 1% або вище.

Пацієнти були рандомізовані в пропорції 1:1 в дві групи: група, яка отримувала пембролізумаб в дозі 200 мг/м<sup>2</sup>, та група, яка отримувала хіміотерапію ( карбоплатин+ паклітаксел або карбоплатин+пеметрексед в стандартних дозах). Курси лікування повторювалися кожних 3 тижні до появи ознак радіологічної прогресії або нестерпного токсичного прояву.

Рівень експресії PD-L1 визначався на скринінгу в локальній лабораторії та надалі в центральній лабораторії за допомогою набору IHC 22C3 pharmDx. Матеріалом дослідження були зразки пухлин, отриманих при інцизійній біопсії чи трепан біопсії. Експресія визначалася як частка пухлинних клітин від загальної кількості, в яких на мембранах міститься PD-L1. Радіографічна оцінка лікування проводилася згідно критеріїв RECIST 1.1.

Виходячи з даних критеріїв було отримано наступні результати. Так, із 3428 скринюваних пацієнтів у 2019 було визначено експресію PD-L1: у 1978 (66%) вона становила 1% або більше, включаючи групу із 922 зразків, де експресія PD-L1 перевищувала 50%. 1275 пацієнтів були включені в дві групи лікування – пембролізумабом (638) та хіміотерапією (637), співставні за демографічними показниками та ознаками захворювання.

За результатами проміжного аналізу було встановлено, що середній термін виживаності значно відрізнявся між двома групами. Тривалість середньої виживаності була 20,0 місяців (95% СІ 15,4-24,9) в групі пацієнтів,

які лікувалися пембролізумабом, та 12,2 місяців (95% СІ 10,4-14,2) в групі лікування хіміотерапією.

Були порівняні результати лікування в підгрупах пацієнтів залежно від рівня експресії PD-L1. Так, середня виживаність у пацієнтів із рівнем експресії PD-L1 20% або більше склала 17,7 місяців (95% СІ 15,3-22,1) в групі лікування пембролізумабом, порівняно із 13,0 місяцями (95% СІ 11,6-15,3) в групі пацієнтів, що отримали хіміотерапію. Аналогічно, в групі пацієнтів із рівнем експресії PD-L1 1% та вище середня виживаність була 16,7 місяців (95% СІ 13,9-19,7) в групі лікування пембролізумабом в порівнянні із 12,1 місяцями (95% СІ 11,3-13,3) в групі пацієнтів, що отримали хіміотерапію. Розрахункова частка пацієнтів, які вижили 24 місяці в групі лікування пембролізумабом та хіміотерапією склала 45% та 30% відповідно в групі пацієнтів з експресією PD-L1 50% та більше; 41% та 30% з експресією PD-L1 20% та більше; 39% та 28% в групі з експресією PD-L1 1% та більше. Таким чином, в усіх підгрупах з різними рівнями експресії PD-L1, де проводилось лікування пембролізумабом, встановлені переваги у виживаності порівняно із групами пацієнтів, які отримали хіміотерапію.

1013 пацієнтів померли або мали ознаки прогресування хвороби в групі з експресією PD-L1 1% та більше, в тому числі 631 із експресією PD-L1 20% та більше, та 454 із експресією PD-L1 50% та більше. Середній безрецидивний період склав 7,1 місяців (95% СІ 5,9-9,0) в групі лікування пембролізумабом та 6,4 місяців (95% СІ 6,1-6,9) в групі пацієнтів, що отримали хіміотерапію.

Об'єктивну відповідь на лікування було зафіксовано в групі пацієнтів з експресією PD-L1 50% та більше у 118 (39%, 95% СІ 34-45) із 229 пацієнтів в групі лікування пембролізумабом та у 96 (32%, 95% СІ 27-38) із 300 пацієнтів в групі лікування хіміотерапією. Значення цього показника у групах пацієнтів з експресією PD-L1 20% та більше та з експресією PD-L1 1% та більше становило 138 (33%, 95% СІ 29-38) із 413 та 117 (29%, 95% СІ 25-34) із 405 відповідно в групі лікування пембролізумабом порівняно із 174 (27%,



95% CI 24-31) із 637 та 169 (27%, 95% CI 23-30) із 637 відповідно в групі лікування хіміотерапією. Середня тривалість відмови на лікування склала 20,2 місяці в групі лікування пембролізумабом в усіх підгрупах експресії PD-L1, та склала 10,8 місяців, 8,3 місяці та 8, 3 місяці для підгруп з експресією PD-L1 50% та більше, експресією PD-L1 20% та більше та експресією PD-L1 1% та більше для групи лікування хіміотерапією.

Побічні явища викликані лікуванням були зафіксовані у 399 (63%) із 636 пацієнтів в групі лікування пембролізумабом та у 553 (90%) із 615 пацієнтів в групі лікування хіміотерапією. Найбільш частими побічними явищами були гіпотирозидизм (69, або 11%) в групі лікування пембролізумабом та анемія (229, або 37%) в групі лікування хіміотерапією.

Виходячи з цього, ми прийшли до висновку, що перша лінія монотерапії пембролізумабом значно покращує загальну виживаність та є менш токсичною у порівнянні із хіміотерапією для пацієнтів із локально розповсюдженим або метастатичним немієлоклітинним раком легень, у яких не виявлено EGFR мутацій та ALK транслокацій, та у яких пухлина експресує PD-L1 як мінімум в 1% клітин. Може бути запропонована як стандартне лікування в першій лінії в зазначеній групі пацієнтів.

## 2 ВИБІР ЛІКУВАЛЬНОЇ ТАКТИКИ ПРИ РАКУ НИРКИ В ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД СТАТУСУ ЕКСПРЕСІЇ PD-L1

Враховуючи вже отримані дані щодо важливості вивчення експресії PD-1 та PD-L1 у пацієнтів з раком легень, ми провели схожу скринінгову діагностику пацієнтів з світлоклітинним раком нирки, що знайшло своє відображення в покращенні тактики лікування. Так, для дослідження було відібрано 1062 пацієнти в 129 центрах 16 країн. 861 пацієнт пройшов рандомізацію. Із них 432 було призначено лікування пембролізумабом в комбінації з аксітінібом, та 429 пацієнтам – сунітінібом. Базові демографічні характеристики та за ознаками хвороби були збалансованими між обома групами. Пацієнти були розподілені в групи ризику (благоприємна, середня, неблагоприємна) згідно рекомендацій Міжнародного Консорціуму по вивченню метастатичної ниркової карциноми- 31,2%, 56,2% та 12,5% відповідно. Із 822 придатних до аналізу зразків у 60,5% було встановлено експресію PD-L1 1% та більше. Середня тривалість лікування склала 10,4 місяців в групі пембролізумаб+аксітініб та 7,8 місяців – в групі сунітінібу.

Частка пацієнтів, які були живі 12 місяців була 89,9% (95% CI 86,4-92,2) в групі пембролізумаб+сунітініб та 78,3% (95% CI 73,8-82,1) в групі сунітінібу. Відповідні показники на рубежі 18 місяців становили 82,3% (95% CI 77,2-86,3) та 72,1% (95% CI 66,3-77,0). Показник середньої виживаності не був досягнутий в жодній із груп. Ризик смерті був на 47% нижчим в групі пембролізумаб+аксітініб в порівнянні із групою сунітінібу ( HR для смерті, 0,53; 95% CI 0,38 – 0,74;  $p < 0,0001$ ).

Середня тривалість безрецидивного періоду склала 15,1 місяців (95% CI 12,6-17,7), в групі пембролізумаб+аксітініб та 11,1 місяців (95% CI 8,7-12,5) в групі сунітінібу. Співвідношення ризиків в групах для прогресії хвороби чи смерті є 0,69 (95% CI 0,57-0,84;  $p < 0,001$ ). Переваги в групі пембролізумаб+аксітініб щодо загальної виживаності та безрецидивного

періоду спостерігали в усіх підгрупах, включаючи категорії прогнозу та експресії PD-L1 (Рис. 2).

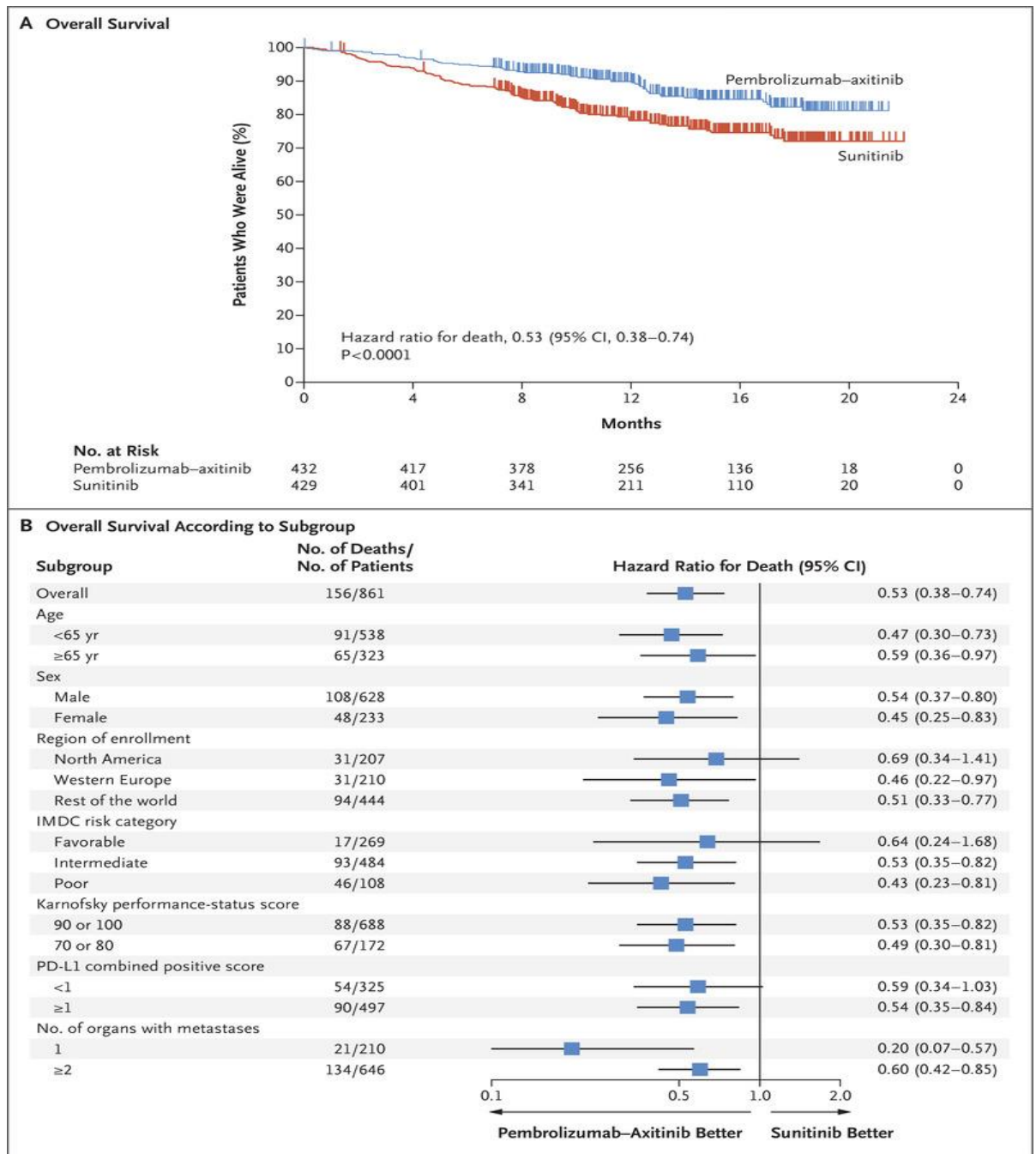


Рисунок 2 – Загальна виживаність хворих на рак нирки в групах лікування пембролізумабом в комбінації з аксітінібом та в групі лікування сунітінібом.

Об'єктивна відповідь на лікування становила 59,3% (95% CI 54,5-63,9) в групі пембролізумаб+аксітініб та 35,7% (95% CI 31,1-40,4) в групі сунітінібу ( $p < 0,001$ ). 5,8% пацієнтів в групі пембролізумаб+аксітініб та 1,9% в групі сунітінібу мали повну регресію (Рис. 3).

Розрахована частка пацієнтів із групи пембролізумаб+аксітініб, у яких відповідь на лікування триває більше 1 року, склала 70,6%; в групі сунітінібу – 61,6%. Побічні явища виникли в 98,4% із 429 пацієнтів в групі пембролізумаб+аксітініб та 99,5% із 425 в групі сунітінібу. Ступінь важкості побічних явищ 3 або більше склав 75,8% в групі пембролізумаб+аксітініб та 70,6% - в групі сунітініб.

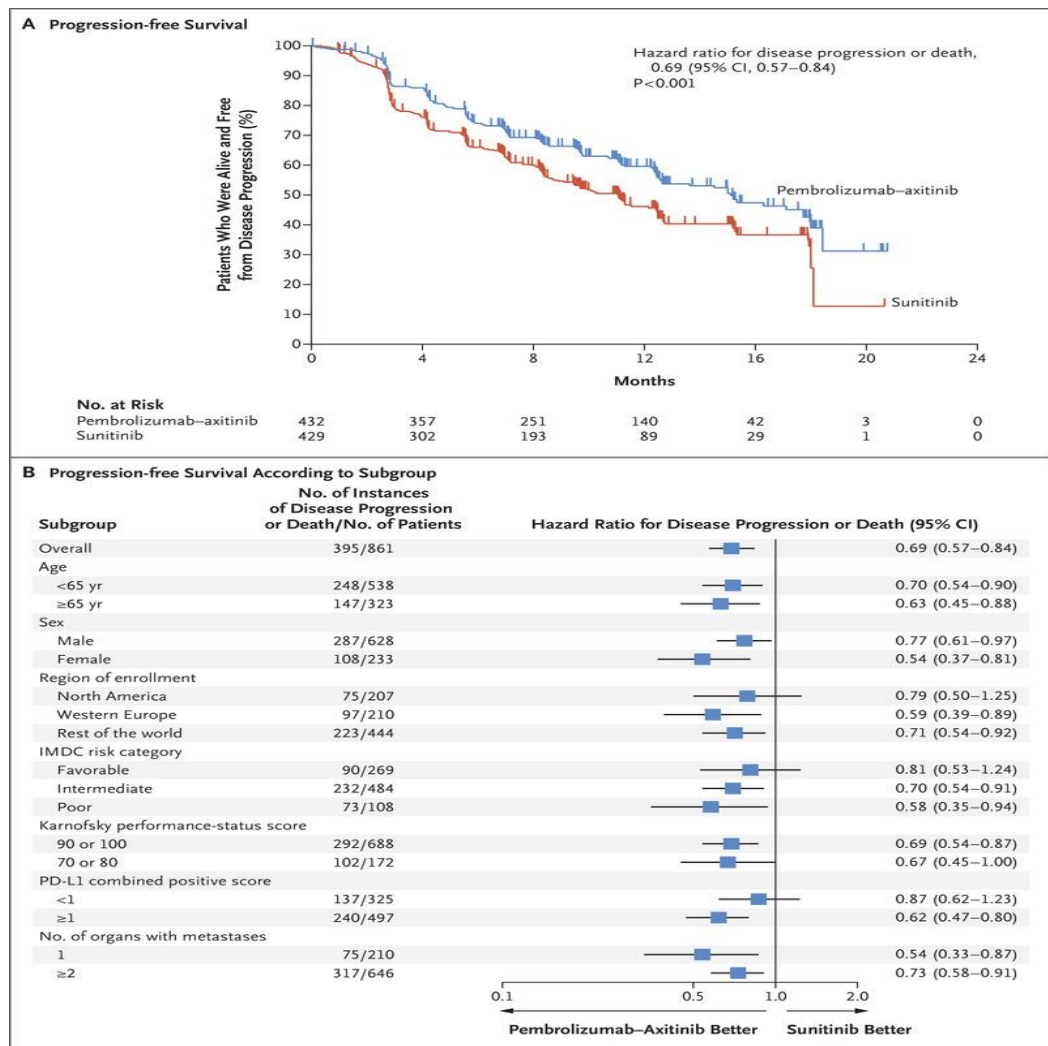


Рисунок 3 – Безрецидивна виживаність серед пацієнтів в групах лікування пембролізумабом в комбінації з сунітінібу у порівнянні із групою лікування сунітінібом.

В обох групах найбільш частими побічними явищами, пов'язаними із лікуванням, були діарея та гіпертензія. В 11 пацієнтів (2,6%) в групі пембролізумаб+аксітініб, які померли від побічних явищ, причинами смерті

були міастенія, міокардит, некротизуючий фасціт, пневмоніт. Серед 15 пацієнтів (3,5%) в групі сунітінібу, які померли від побічних явищ, 7 пацієнтів (1,6%) причинами були побічні явища пов'язані із лікуванням, а саме гострий інфаркт міокарду, серцевий напад, гепатит, внутрішня кровотеча, внутрішньочерепна кровотеча, пневмонія).

### **3 ДОСЛІДЖЕННЯ МОРФОЛОГІЧНИХ ТА ІМУНОГІСТОХІМІЧНИХ ОСОБЛИВОСТЕЙ ПЕРЕДМІХУРОВОЇ ЗАЛОЗИ**

#### ***Зразки пухлин тканини передміхурової залози***

Дослідження проводилося на біопсійному матеріалі, отриманому під час проведених операцій на базі Сумської обласної клінічної лікарні та Сумської міської клінічної лікарні №1. Для дослідження були відібрані зразки тканин раку передміхурової залози з наявністю та відсутністю інтралюмінальних включень (простатоліти, corpora amylacea). Всього було вивчено 30 зразків раку передміхурової залози з включеннями (експериментальна група, Е) та 30 зразків раку передміхурової залози без них (контрольна група, К). Контрольна та експериментальна групи були розділені на 2 підгрупи в залежності від ступеню злоякісності, котрий був визначений за шкалою Глісона на пухлини з помірним (К2 та Е2) та низьким (К3 та Е3) ступенем диференціації. До групи помірнодиференційованих пухлин відносилися раку передміхурової залози 7-8 ступеня за шкалою Глісона (2-4 клас), до низькодиференційованих – 9-10 ступеня за шкалою Глісона (5 клас).

#### ***Протокол комісії етики***

Проведене дослідження було схвалене етичним комітетом Медичного інституту Сумського державного університету (протокол №3/6 від 07.06.2016 р.).

#### ***Гістологічний та гістохімічний методи***

Для гістологічного дослідження біологічний матеріал фіксували у 10% розчині нейтрального буферного формаліну впродовж 24 годин. У подальшому матеріал зневоднювали і просочували парафіном в апараті карусельного типу «АТМ-4М» (Україна). На ротаційному мікротомі Shandon Finnesse 325 (Thermo Scientific) виконували парафінові серійні зрізи товщиною  $4 \times 10^{-6}$  м. Депарафінізовані зрізи забарвлювали гематоксиліном та еозином.

***Імуногістохімічне дослідження тканини раку передміхурової залози***

Серійні зрізи товщиною  $4 \times 10^{-6}$  м, виготовлені з підготовлених гістологічних парафінових блоків, наносили на адгезивні скельця SuperFrost (Thermo Scientific) і висушували за температури  $37^{\circ}\text{C}$  упродовж 18 годин. Депарафінізовані зрізи підлягали демаскуванню антигенів термічним методом шляхом нагрівання зрізів у цитратному буфері (pH 6,0) за температури  $95\text{--}98^{\circ}\text{C}$ . Для візуалізації результатів імуногістохімічного (ІГХ) дослідження застосовували систему детекції “UltraVision Quanto Detection System HRP Polymer” (Thermo Scientific), що передбачала блокування ендогенної пероксидазної активності 3% гідрогену пероксидом, блокування неспецифічного фонового фарбування з використанням «Ultra V Block», посилення реакції «Primary Antibody Amplifier Quanto». Як хромоген використовувався діамінобензидин (DAB). У дослідженнях використана така панель антитіл («Thermo Scientific», США): рецептори до андрогену (AR), проапоптотичний білок p53 (p53), матриксна метало-протеїназа 1 (MMP1), судинний ендотеліальний фактор росту (VEGF), білок теплового шоку 86 кДа (Hsp90), білок теплового шоку 70 кДа (Hsp70), CD68, проапоптотичний протеїн Вах та остеонектин (OSN) (табл. 2).

Таблиця 2 – Панель антитіл для імуногістохімічного дослідження

Антитіло	Імунізована тварина	Клон	Розведення	Патерн експресії
AR	Кролик	Поліклон	1:200	Ядро
p53	Миша	SP5	1:100	Ядро
MMP1	Кролик	Поліклон	1:50	Цитоплазма
VEGF	Кролик	Поліклон	1:200	Цитоплазма та мембрана
Hsp90	Кролик	Поліклон	1:100	Ядро та цитоплазма
Hsp70	Кролик	Поліклон	1:100	Ядро та цитоплазма
Вах	Кролик	Поліклон	1:100	Цитоплазма
CD68	Миша	KP1	1:100	Цитоплазма
OSN	Кролик	Поліклон	1:50	Цитоплазма

Проведення морфометричних досліджень складових елементів мікропрепаратів проводили за допомогою морфометричної програми «SEO Scan ICX 285 AK-F IEE-1394» (Україна) та програми “Zen 2.0” (Німеччина). У середовищі зазначених програм за допомогою морфометричних інструментів виділяли круглі поля зору діаметром 1 000 мкм, всередині яких підраховувалася кількість імунопозитивно забарвлених клітин. Отримання та зберігання знімків препаратів проводили за допомогою цифрової системи виведення зображення «SEO Scan ICX 285 AK-F IEE-1394» (Україна) та «ZEN» для мікроскопів «Carl Zeiss» (Німеччина).

В якості контролю якості проведеного ІГХ дослідження проводили активний (використання тканини, з попередньо встановленою позитивною та негативною реакцією) та пасивний контроль отриманих результатів.

#### ***Статистичний аналіз***

Отримані дані перевіряли на нормальний розподіл за критерієм Шапіро-Уїлка. У разі ненормального розподілу використовували непараметричний метод – тест Мана-Уїтні. У випадку правильного розподілу дані порівнювалися за допомогою параметричного t-критерію Стьюдента для визначення достовірності різниці. Результати вважали статистично достовірними при ступеню вірогідності більше 95% ( $p < 0,05$ ). Графічне відображення результатів статистичного аналізу було виконане за допомогою програми GraphPad Prism 7.04.

#### ***Гістологічна будова пухлинної тканини***

У роботі проводилося морфологічне порівняння зразків пухлинної тканини з помірним та низьким ступенем диференціювання для обох досліджуваних груп. Гістологічний аналіз тканини раку передміхурової залози експериментальної групи з помірним ступенем диференціювання (E2) показав присутність залоз, сформованих атипovими клітинами з гіперхромними ядрами, формуванням криброзних та псевдотрабекулярних структур, між пухлинними залозами спостерігався добре розвинутий



стромальний компонент (рис. 4А-Б). Деякі з пухлинних залоз відокремлювалися та мали вигляд ланцюга. Більшість залоз мала просвіт.

Тканина зразків раку передміхурової залози групи Е3 характеризувалася значним порушенням гістоархітекtonіки за рахунок спрощення будови пухлинних залоз, які формували множинні ланцюги та гнізда, мали незначну кількість стромального компоненту. Більшість залоз не мали просвіту, часто зразки даної групи були представлені виключно пухлинним полем (рис. 5А-Б).

Зразки експериментальної групи (Е2 та Е3) характеризувалися наявністю внутрішньопросвітних включень в пухлинних залозах. Ці включення мали вигляд округлих утворень, які повторювали форму просвіту залози. Для простатолітів був характерний темно-коричневий колір та більш гомогенна структура. Corpora amyloacea мали шарувату будову та темно-рожевий колір.

Для тканин зразків експериментальної та контрольної групи була характерна наявність запальної інфільтрації навколо пухлинних залоз (рис. 6А-Б, 7А-Б). Проте, вираженість запального процесу була більшою для експериментальної групи. Запальний інфільтрат складався переважно з клітин макрофагального ряду, лімфоцитів та нейтрофілів.

### ***ІГХ характеристика пухлинної тканини***

Імуногістохімічне дослідження експресії рецепторів андрогену у тканині раку передміхурової залози підгруп Е2 та Е3 показало виразну ядерну реакцію у пухлинних клітинах карциноми та поодиноких клітинах навколопухлинної строми. Кількість позитивних клітин для підгрупи Е2 відповідало  $396,79 \pm 26,02$ , для підгрупи Е3  $360,91 \pm 36,87$  пухлинних клітин у полі зору (рис. 4В-Г, 5В-Г). Кількість позитивно-забравлених ядер для зразків підгруп К2 та К3 становило  $417,17 \pm 39,61$  та  $424,88 \pm 53,76$  клітин в полі зору відповідно (рис. 6В-Г, 7В-Г).

Рівень експресії проапоптотичного р53-протеїну у зразках пухлинної тканини підгруп Е2 та Е3 становив  $33,09 \pm 3,30$  та  $46,70 \pm 2,15$  клітин в полі

зору відповідно (рис. 4Д-Е, 5Д-Е). Забарвлення мало ядерний характер, позитивні клітини були розміщені переважно невеликими групами. У передміхуровій залозі підгруп К2 та К3 було виявлено  $30,49 \pm 2,96$  та  $42,48 \pm 3,36$  пухлинних клітин в полі зору відповідно (рис. 6Д-Е, 7Д-Е).

Інший проапоптотичний білок Вах мав цитоплазматичний характер експресії та помірну інтенсивність сигналу. У зразках пухлин підгрупи Е2 було ідентифіковано  $65,18 \pm 3,53$  позитивних клітин, а у підгрупі Е3 –  $58,05 \pm 3,79$  (рис. 4Є-Ж, 5Є-Ж). Рівні експресії Вах у підгрупах К2 та К3 відповідали  $42,69 \pm 3,64$  та  $46,54 \pm 4,68$  пухлинним клітинам у полі зору (рис. 6Є-Ж, 7Є-Ж).

Білок теплового шоку Hsp70 мав змішаний ядерно-цитоплазматичний характер візуалізації. Кількість Hsp70-позитивних пухлинних елементів у підгрупі Е2 становила  $325,57 \pm 20,53$ , для підгрупи Е3 –  $298,56 \pm 17,19$  клітин в полі зору (рис. 4І-К, 5І-К). Рівень позитивно-забарвлених пухлинних клітин у підгрупі К2 становив  $274,73 \pm 32,72$ , для підгрупи К3 цей показник складав  $260,72 \pm 17,7$  (рис. 6І-К, 7І-К).

Під час імуногістохімічного дослідження білка теплового шоку Hsp90 була виявлена його експресія в ядрі та цитоплазмі неопластичних клітин. Кількість позитивно-забарвлених елементів у підгрупах Е2 та Е3 становила  $352,84 \pm 26,39$  та  $331,28 \pm 28,5$  відповідно (рис. 4Л-М, 5Л-М). Для підгруп К2 та К3 ці показники відповідали значенням  $413,3 \pm 39,66$  та  $454,98 \pm 17,42$  клітин в полі зору (рис. 6Л-М, 7Л-М). Також виявлена його присутність між шарами *corpora amylacea* та застійному секреті залоз.

Оцінка експресії ендотеліального фактору росту вказувало на цитоплазматичний характер реакції у вигляді зерен та грудочок. У підгрупах Е2 та Е3 кількість VEGF-позитивних пухлинних клітин становила  $50,65 \pm 3,91$  та  $50,97 \pm 2,86$  (рис. 4Н-О, 5Н-О). Пухлинна тканина підгруп К2 та К3 містила в середньому  $68,84 \pm 4,80$  та  $54,08 \pm 2,09$  позитивних неопластичних клітин у полі зору відповідно (рис. 6Н-О, 7Н-О).

Білок матриксна металопротеїназа 1 була виявлена у вигляді дифузного цитоплазматичного забарвлення. Вона експресувалася як пухлинними клітинами, так і елементами стромального компонента. Кількість позитивних пухлинних клітин у тканині підгруп E2 та E3 складала  $32,49 \pm 1,6$  та  $43,92 \pm 1,82$  відповідно (рис. 4П-Р, 5П-Р). У підгрупах K2 та K3 було виявлено  $32,54 \pm 2,46$  та  $41,13 \pm 2,45$  MMP1-позитивних клітин відповідно (рис. 6П-Р, 7П-Р).

Маркер клітин макрофагального ряду CD68 мав цитоплазматичний характер експресії. У пухлинній тканині та навколопухлинній стромі зразків підгруп E2 та E3 було виявлено  $138,11 \pm 5,57$  та  $136,86 \pm 4,05$  CD68-позитивних клітин в полі зору (рис. 4С-Т, 5С-Т). Для підгруп K2 та K3 цей показник становив  $85,60 \pm 5,22$  та  $98,70 \pm 6,09$  позитивних клітин відповідно (рис. 6С-Т, 7С-Т).

Глікопротеїн OSN був виявлений у вигляді дифузної цитоплазматичної реакції в пухлинних клітинах. Рівень його експресії у підгрупах E2 та E3 складав  $102,03 \pm 5,05$  та  $53,11 \pm 4,59$  позитивних пухлинних клітин в полі зору відповідно (рис. 4З-И, 5З-И). Підгрупи K2 та K3 мали  $43,10 \pm 3,44$  та  $30,50 \pm 2,88$  OSN-позитивних неопластичних клітин (рис. 6З-И, 7З-И).

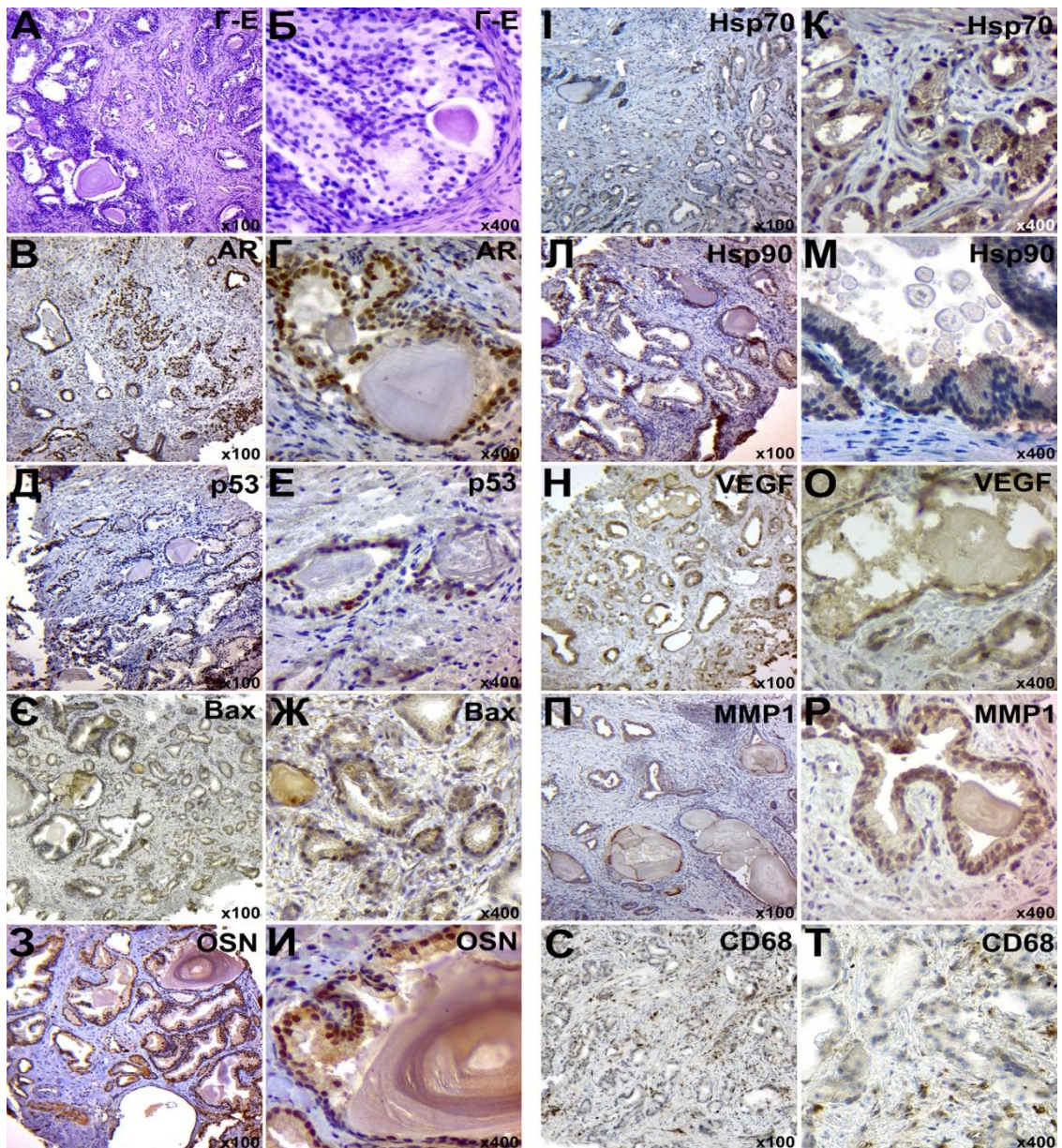


Рисунок 4 – Імуногістохімічне дослідження тканини раку передміхурової залози експериментальної групи, помірного ступеня диференціації (E2): А–Б – забарвлення гематоксиліном та еозином; В–Г – ІГХ виявлення AR; Д–Е – ІГХ ідентифікація білка p53; Є–Ж – ІГХ виявлення білка Vax; З–И – ІГХ дослідження експресії OSN; І–К – ІГХ виявлення білка Hsp70; Л–М – ІГХ виявлення білка Hsp90; Н–О – ІГХ індикація VEGF; П–Р – ІГХ виявлення MMP1; С–Т – ІГХ ідентифікація CD68. Хромоген – діамінобензидин, додаткове контрастування ядер гематоксиліном Майєра. Збільшення вказане в правому нижньому куті кожного зображення.

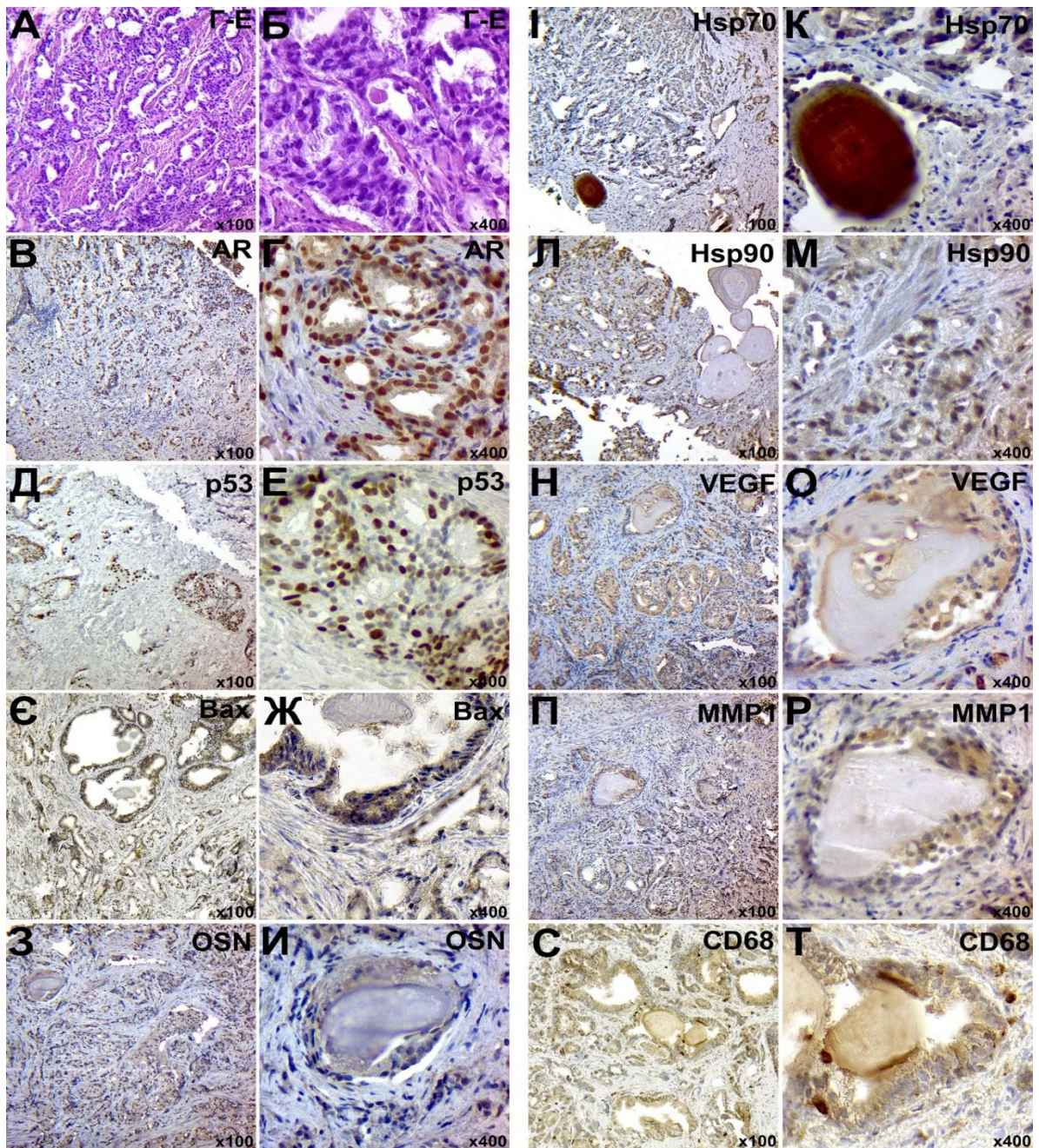


Рисунок 5 – Імуногістохімічне дослідження тканини раку передміхурової залози експериментальної групи, низького ступеня диференціації (E3): А–Б – забарвлення гематоксиліном та еозином; В–Г – ІГХ виявлення AR; Д–Е – ІГХ ідентифікація білка p53; Є–Ж – ІГХ виявлення білка Vax; З–И – ІГХ дослідження експресії OSN; І–К – ІГХ виявлення білка Hsp70; Л–М – ІГХ виявлення білка Hsp90; Н–О – ІГХ індикація VEGF; П–Р – ІГХ виявлення MMP1; С–Т – ІГХ ідентифікація CD68. Хромоген – діамінобензидин, додаткове контрастування ядер гематоксиліном Майєра. Збільшення вказане в правому нижньому куті кожного зображення.

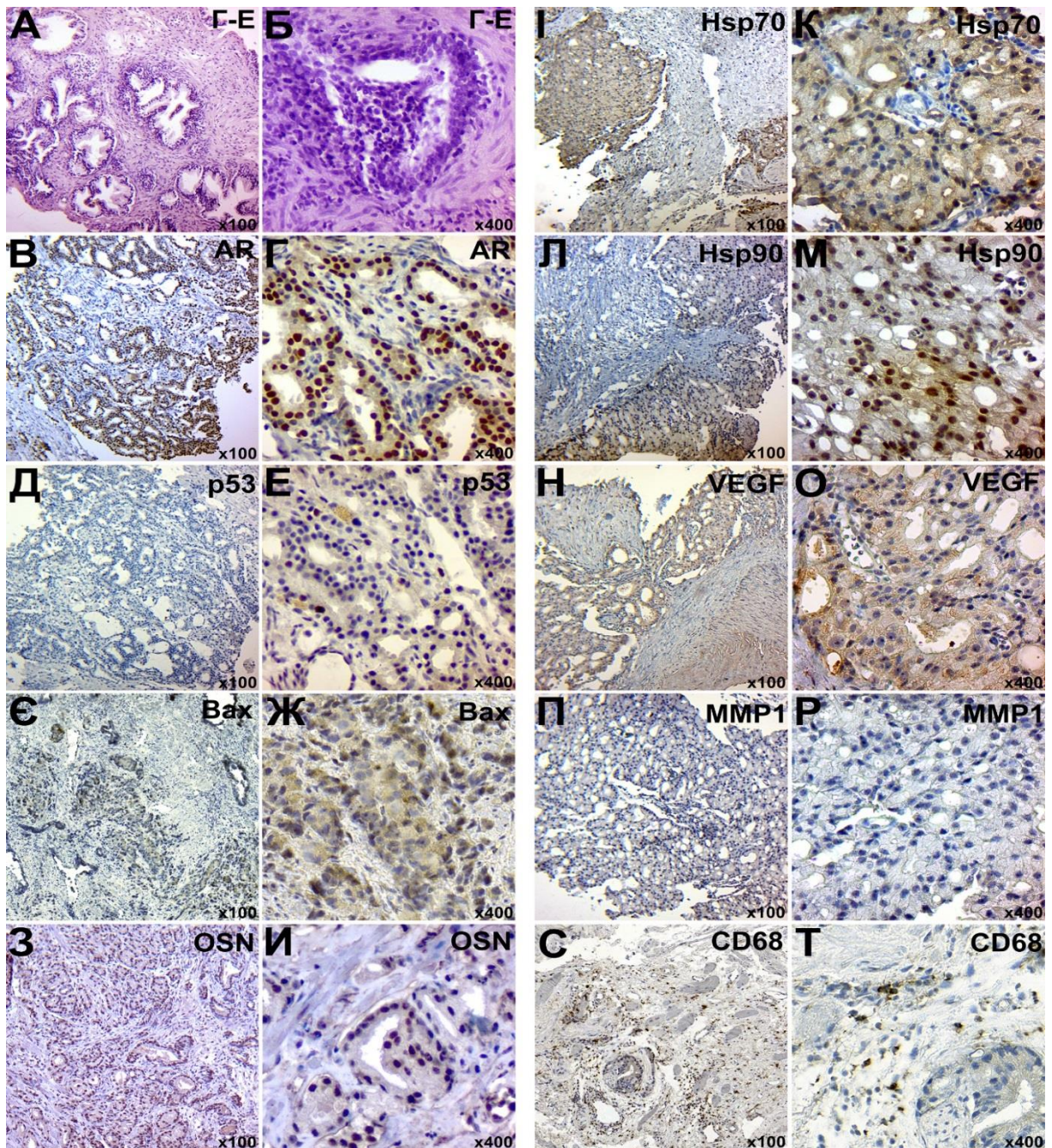


Рисунок 6 – Імуногістохімічне дослідження тканини раку передміхурової залози контрольної групи, помірного ступеня диференціації (K2): А–Б – забарвлення гематоксиліном та еозином; В–Г – ІГХ виявлення AR; Д–Е – ІГХ ідентифікація білка p53; Є–Ж – ІГХ виявлення білка Bax; З–И – ІГХ дослідження експресії OSN; І–К – ІГХ виявлення білка Hsp70; Л–М – ІГХ виявлення білка Hsp90; Н–О – ІГХ індикація VEGF; П–Р – ІГХ виявлення MMP1; С–Т – ІГХ ідентифікація CD68. Хромоген – діамінобензидин, додаткове контрастування ядер гематоксиліном Майєра. Збільшення вказане в правому нижньому куті кожного зображення.

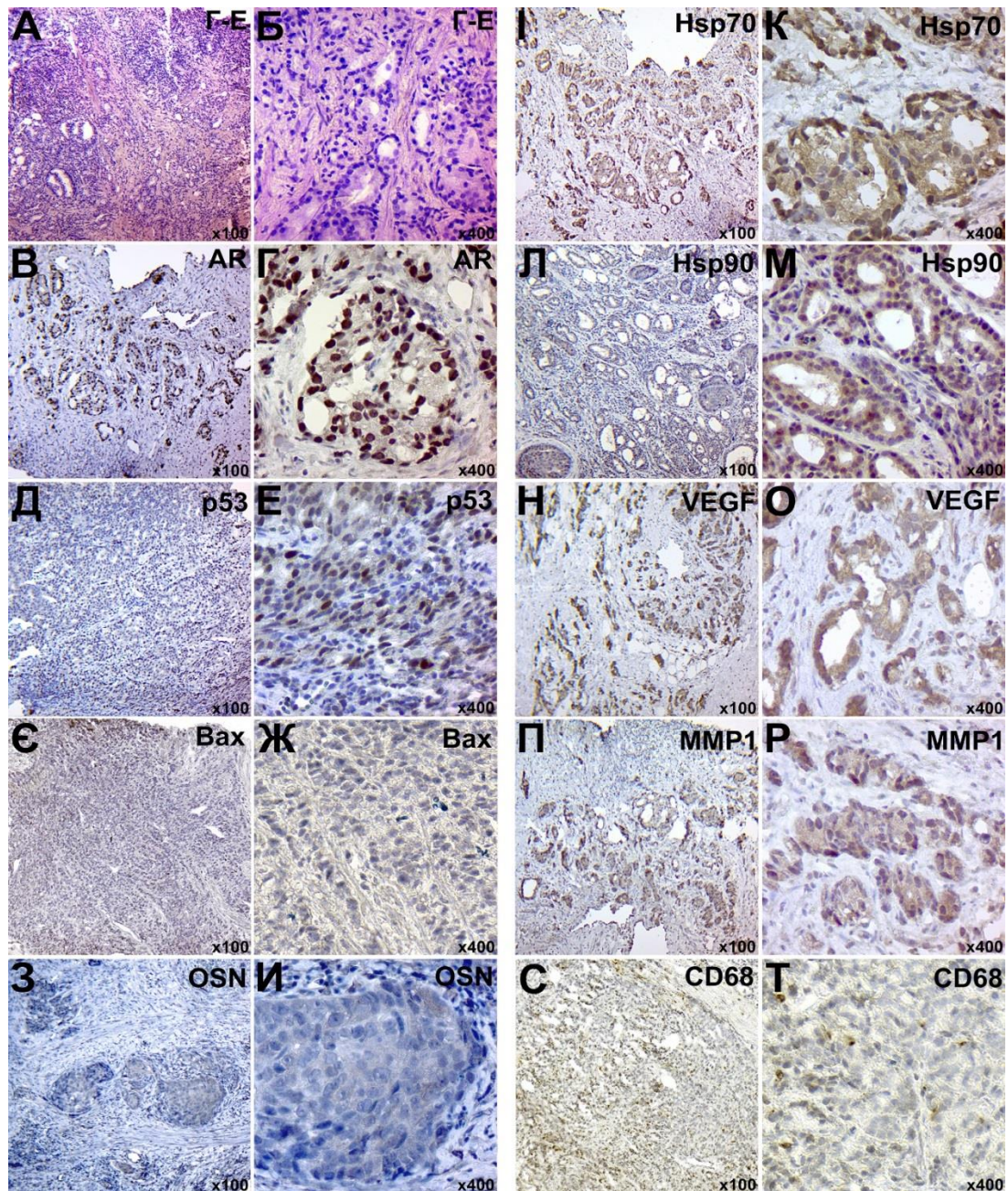


Рисунок 7 – Імуногістохімічне дослідження тканини раку передміхурової залози контрольної групи, низького ступеня диференціації (К3): А–Б – забарвлення гематоксиліном та еозином; В–Г – ІГХ виявлення AR; Д–Е – ІГХ ідентифікація білка p53; Є–Ж – ІГХ виявлення білка Vax; З–И – ІГХ дослідження експресії OSN; І–К – ІГХ виявлення білка Hsp70; Л–М – ІГХ виявлення білка Hsp90; Н–О – ІГХ індикація VEGF; П–Р – ІГХ виявлення MMP1; С–Т – ІГХ ідентифікація CD68. Хромоген – діамінобензидин, додаткове контрастування ядер гематоксиліном Майєра. Збільшення вказане в правому нижньому куті кожного зображення.

## 4 ІМУНОГІСТОХІМІЧНІ ХАРАКТЕРИТИКИ РАКУ МАТКОВИХ ТРУБ

Дослідження проведено на операційному матеріалі, отриманому від 71 пацієнтки з первинним раком маткових труб у Сумському обласному онкологічному диспансері. При забарвленні зрізів гематоксиліном та еозином було визначено гістогенез та ступінь злоякісності, поширення пухлини (ступінь інвазії в стінку маткової труби, поширення на тазові органи), наявність метастазів у регіонарних лімфатичних вузлах.

Для проведення імуногістохімічного дослідження на адгезивні скельця розміщували зрізи товщиною 4 мкм, виготовлені з парафінових блоків, які підлягали стандартній депарафінізації та зневодненню у ксилолі та спиртах зростаючих концентрацій. Демаскування антигенів проводили у водяній бані при температурі 97–98° С. Реакцію антиген-антитіло візуалізували з використанням системи детекції «Ultra Vision Quanto Detection System HRP DAB Chromogen» (Thermo scientific», США), яка включала блокування ендогенної активності пероксидази перекисем водню, блокування неспецифічного фонового фарбування з використанням «Ultra V block», посилення реакції «Primary Antibody Amplifier Quanto». Кінцеву візуалізацію проводили діамінобензидином з дофарбовуванням ядер гематоксиліном Маєра.

З метою виключення впливу гістогенезу пухлини на імунофенотип ракових клітин критерієм включення у досліджувану групу для визначення молекулярно-біологічних маркерів пухлин була наявність серозної аденокарциноми маткової труби (САкМТ).

У дослідженнях використана наступна панель антитіл («Thermo scientific») (Табл. 3).



Таблиця 3 – Панель антитіл, використаних для імуногістохімічного дослідження

Антитіло	Імунізована тварина	Клон	Розведення	Локалізація в клітині	Особливості оцінювання
ER	Кролик	SP1	1:200	Ядро	Згідно рекомендацій D.C. Allred з урахуванням частки забарвлених ядер та інтенсивності їх фарбування
PR	Кролик	YR85	1:150	Ядро	
HER2/neu	Кролик	SP3	1:100	Мембрана	В балах (від 0 до 3), згідно з рекомендаціями виробника з урахуванням повноти та інтенсивності мембранного фарбування
Ki-67	Кролик	SP6	1:100	Ядро	0 балів – негативна реакція, 1 бал – слабкопозитивна реакція (n=0–30%), 2 бали – помірнопозитивна реакція (30<n<60%), 3 бали – сильнопозитивна реакція (n>60%)
p53	Миша	SP5	1:100	Ядро	Слабкопозитивна реакція (10–25% позитивно пофарбованих пухлинних клітин), помірнопозитивна реакція (25–50%), сильнопозитивна реакція (>50%)
bcl-2	Миша	100/D5	1:100	Цитоплазма	Низький рівень експресії (1+) – слабке цитоплазматичне забарвлення більше 10% пухлинних клітин; помірний (2+) – забарвлення середньої інтенсивності більше 10%; високий (3+) – інтенсивне забарвлення більше 10% пухлинних клітин
VEGF	Кролик	Поліклон	1:200	Цитоплазма та мембрана	0 балів – відсутність цитоплазматичної експресії, 1 бал – слабке цитоплазматичне фарбування менше 10% клітин, 2 бали – слабка чи помірна експресія в 10–50% клітин, 3 бали – виражена та помірна експресія більш ніж у 50% клітин

Обробка даних проводилася за допомогою програми Microsoft Excel 2010 з додатком Attestat 12.0.5. Оцінку вірогідності розбіжностей порівнюваних показників проводили з використанням t-критерію Стюдента. Виявлення й оцінку характеру зв'язків між показниками проводили за допомогою рангової кореляції з розрахунком непараметричного коефіцієнта кореляції Спірмена (r). Результати вважали статистично достовірними при ступеню вірогідності більше 95% (p<0.05).

Нами встановлено, що первинний рак маткових труб становить 1.13% серед злоякісних новоутворень жіночої репродуктивної системи та 4.36% серед злоякісних новоутворень додатків матки (пік захворюваності припадає на 50 до 69 років. Карциноми фаллопієвих труб мають переважно однобічну

локалізацію, двостороннє ураження виявлено лише у 16.9% випадків. Неоплазії маткових труб у переважній більшості випадків (60,6%) виявляються на I–II стадіях захворювання.

Отримані нами результати гістологічного дослідження показують, що переважну більшість злоякісних новоутворень маткових труб складала САкМТ (93.0% випадків) (Рис. 8).

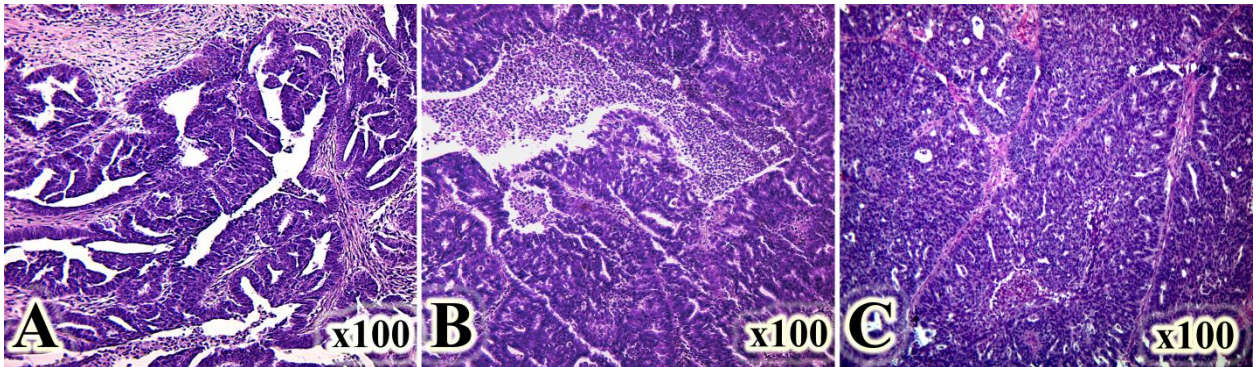


Рисунок 8 – САкМТ маткової труби. А – G1(низького ступеня злоякісності); В – G2(високого ступеня злоякісності); С – G3(високого ступеня злоякісності). Забарвлення гематоксиліном та еозином.

Рідше виявлялися випадки муцинозної (2.8%), світлоклітинної (2.8%) аденокарциноми та плоскоклітинної (1.4%) карциноми. САкМТ у 88.4% випадків була високого ступеня злоякісності (high-grade), що включали низько- і помірнодиференційовані карциноми (G<sub>2</sub>, G<sub>3</sub>).

Імуногістохімічне дослідження виявило варіабельну експресію до рецепторів естрогену (ER) та прогестерону (PR) (Рис. 9А,В): ER+PR+– 62.1%, ER+PR– – 21.2%. Висока експресія ER і PR у серозних пухлинах маткових труб корелює з високим ступенем диференціювання новоутворень та початковими клінічними стадіями захворювання ( $p < 0.001$ ). При метастазуванні в лімфатичні вузли експресія ER ( $p < 0,001$ ) та PR ( $p < 0,001$ ) в ракових клітинах була значно меншою, чим у випадках без наявності лімфогенного метастазування ( $p < 0.05$ ). Результати проведених досліджень показали, що гіперекспресія HER2/neu не характерна для САкМТ (80.9% пухлин були рецептор-негативними).

У більшості випадків клітини неоплазій маткових труб експресували рецептори до білка Ki-67 (Рис. 9C,D), у середньому складаючи  $55.0 \pm 12.2\%$ . Рівень проліферації пухлинних клітин характеризувався оберненим зв'язком з рівнем експресії стероїдних гормонів ( $p < 0.05$ ). У групах із повністю позитивним рецепторним статусом (ER+PR+) високий рівень проліферативної активності (більше ніж 60% Ki67-позитивних клітин) виявлено лише в 46.3%. Навпаки, при повному рецепторному негативі (ER–PR–) або наявності лише ER у пухлинній тканині (ER+PR–) в 63.4 та 71.4% випадків був високий рівень проліферації.

У 13 випадках (19,7%) виявлена негативна реакція на наявність проапоптотичного білка p53 (Рис. 9F). У 53 випадках (80.3%) САкМТ були p53-позитивними, серед яких в 9 випадках (13.6%) виявлено слабкопозитивну реакцію, у 13 випадках (19.7%) – помірнопозитивну та у 31 випадку (47%) спостерігалася сильнопозитивна реакція (рис.2 E). Встановлено сильний кореляційний зв'язок між присутністю у пухлині p53 та клінічною стадією захворювання ( $r=0.77$ ,  $p < 0.001$ ) та ступенем диференціювання неоплазії ( $r=0.58$ ,  $p < 0.001$ ) (табл. 4).

Таблиця 4 – Результати дослідження експресії p53 у САкМТ залежно від розповсюдженості процесу, наявності лімфогенного метастазування та ступеня диференціювання неоплазії

Критерії оцінки		Середнє значення p53, %
Стадія хвороби за класифікацією FIGO	I	$10.5 \pm 2.2$
	II	$46.8 \pm 5.2$
	III	$71.7 \pm 3.9$
Наявність ураження регіональних лімфатичних вузлів	N <sub>0</sub>	$29.7 \pm 3.6$
	N <sub>1</sub>	$80.6 \pm 2.7$
Ступінь диференціювання пухлини	G <sub>1</sub>	$5.6 \pm 2.4$
	G <sub>2</sub>	$35.6 \pm 6.2$
	G <sub>3</sub>	$62.2 \pm 4.2$

У 81.8% випадків пухлини маткових труб були bcl-2-позитивними, з яких 96,3% випадків супроводжувалися наявністю ER та 71.4% випадків –

PR. Установлено позитивні кореляційні зв'язки між експресією bcl-2 та ER ( $r=0.84$ ,  $p<0.001$ ) і PR ( $r=0,69$ ,  $p<0,001$ ). На противагу p53, під час дослідження антиапоптотичного білка встановлено негативний помірний кореляційний зв'язок між bcl-2 та клінічною стадією захворювання ( $r=-0.44$ ,  $p<0.001$ ) та ступенем анаплазії пухлини ( $r=-0.52$ ,  $p<0.001$ ). При метастазуванні САКМТ знижується експресія антиапоптотичного білка ( $r=-0,39$ ,  $p<0,01$ ).

Установлено взаємозв'язки між експресією Ki-67 та p53 ( $p<0.05$ ). У групі з високою експресією Ki-67 переважали пацієнти з високою експресією p53 (58.3% випадків). Спостерігалась наявність негативного кореляційного зв'язку між експресією Ki-67 та bcl-2 ( $p<0.05$ ).

Цитоплазматична експресія VEGF виявлялася безпосередньо як у пухлинних клітинах, так і в ендотелії судин. У більшості хворих (87.9%) була виявлена помірна або сильна цитоплазматична реакція в ендотеліальних клітинах та більше, ніж у 70% пухлинних клітинах, розміщених дифузно в усіх полях зору (Рис. 9G,H).

Ми установили, що ангіогенний потенціал злоякісних пухлин маткових труб залежав від рівня диференціювання неоплазії ( $p<0.05$ ) та клінічної стадії захворювання ( $p<0.05$ ). Крім того, всі випадки метастазування у регіонарних лімфатичних вузлах супроводжувалися високою експресією рецепторів VEGF, про що свідчить залежність метастазування первинного раку маткових труб від ангіогенезу. У цілому стероїд-негативні пухлини маткових труб характеризувалися більш високим рівнем експресії VEGF. Установлено слабкий кореляційний зв'язок між експресією VEGF та p53 ( $r=0.25$ ,  $p<0.05$ ). Статистично достовірного взаємозв'язку між експресією рецепторів VEGF та наявністю рецепторів Ki-67 та bcl-2 у нашому дослідженні не виявлено ( $p>0.05$ ).

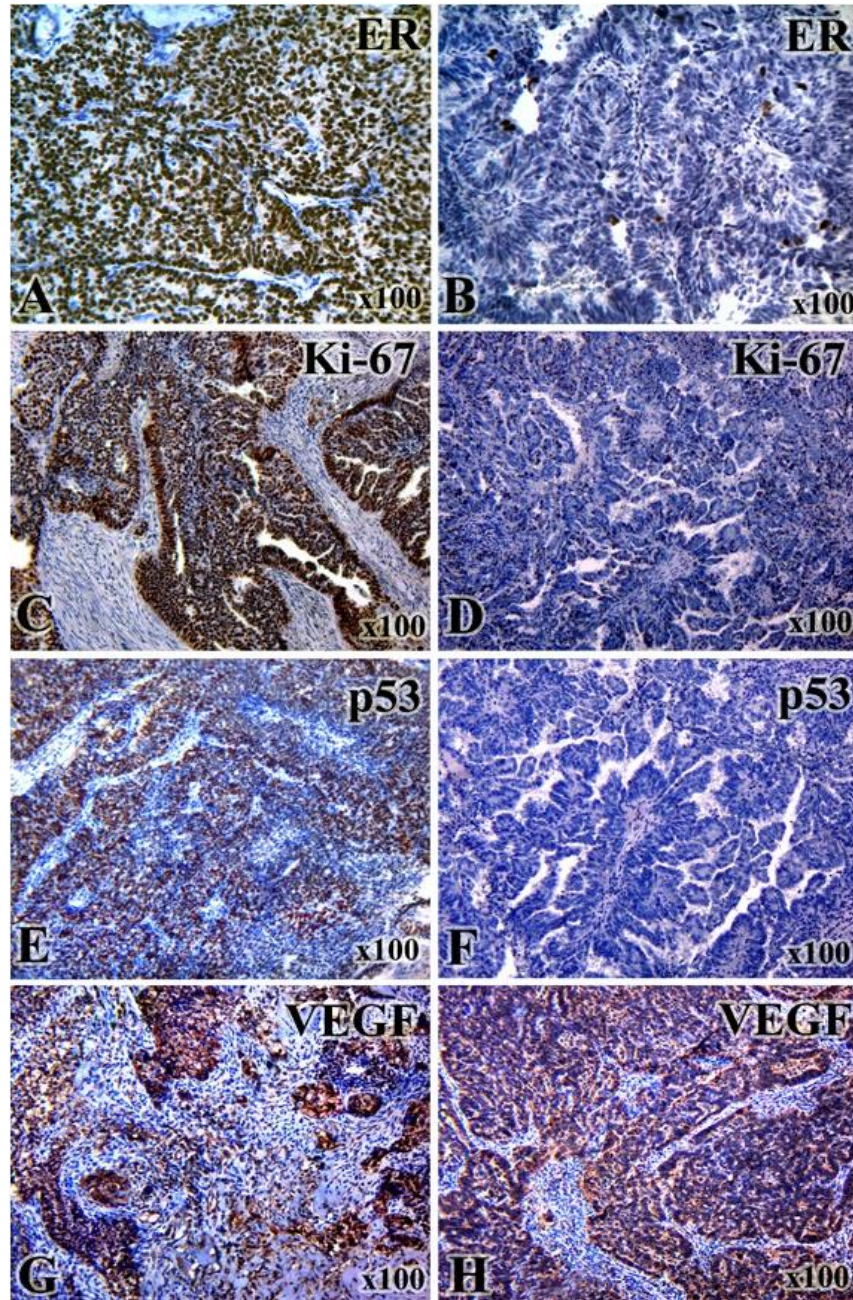


Рисунок 9 – Серозна аденокарцинома маткових труб. Імуногістохімічне дослідження експресій ER, Ki67, p53 та VEGF.

## 5 УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

В умовах сучасного прогресу та зростання економічного розвитку залишаються актуальними питання ураження працездатного населення злоякісними пухлинами, які з кожним роком мають тенденцію до зростання та «омолодження». Так, на сьогоднішній день в Україні, як і у світі в цілому, ризик розвитку пухлин різноманітних локалізацій прогресивно зростає. Рівень захворюваності за останні 40 років збільшився більш ніж утричі.

Саме тому застосування рідинної біопсії (сфокусована на аналізі ЦПК та цпДНК у крові хворих на рак) в діагностичних цілях може значно покращити діагностику безсимптомних проявів захворювання. Однак впровадження рідинної біопсії є не простим завданням. Для встановлення критеріїв оцінки результатів ПЦР в реальному часі, повинна бути формована єдина модель діагностики тканинної біопсії пухлини (морфологічна та імуногістохімічна оцінка), чітка класифікація з врахуванням первинних та вторинних змін в пухлині. Тому створення банку біоматеріалів всіх типів пухлин різноманітних локалізацій та численні молекулярно-генетичні дослідження тканин є необхідним мінімумом для репрезентативного аналізу вільноцируючих пухлинних ДНК в крові пацієнтів.

Проаналізувавши особливості сучасних методів діагностики раку легень, ми дійшли висновку, що незважаючи на певні вітчизняні успіхи у діагностиці раку легень за допомогою поширених удосконалених методів комп'ютерної томографії та біопсії, необхідне впровадження зарубіжного досвіду із скринінгу на рак легень, бо існуючі найсучасніші методи діагностики дозволяють розпізнати онкологічне захворювання на ранніх стадіях виникнення. Впровадження рідинної біопсії унікальне і тим, що ми можемо спотерігати за ефективністю терапевтичної тактики на всіх етапах лікування. Тобто, в режимі «он-лайн» спостерігати за реакцією пухлини на таргетну терапію, що допомагає лікарям у виборі препаратів. Так, нами було

проаналізовано відповідь немілкоклітинного раку легень на обрану терапевтичну стратегію з наступною оцінкою її ефективності. В наших дослідженнях 3 фази лікування пацієнтів з раніше нелікованими локально розповсюдженими та метастатичними формами немілкоклітинного раку легень, у яких не виявлено EGFR мутацій та ALK транслокацій, монотерапія пембролізумабом значно покращила загальну виживаність порівняно із стандартною хіміотерапією у пацієнтів з експресією PD-L1 50% та більше, експресією PD-L1 20% та більше, експресією PD-L1 1% та більше. Профіль токсичності в групі терапії пембролізумабом був кращим у порівнянні із лікуванням хіміотерапією.

Було встановлено взаємозв'язок між більш високим рівнем експресії PD-L1 та кращими результатами лікування для монотерапії пембролізумабом. Показник відношення ризиків (HR) загальної виживаності був найнижчим для підгрупи пацієнтів з експресією PD-L1 50% та більше, що може відображати і зростаючі переваги в лікуванні саме в цій підгрупі хворих. Проте переваги в показниках лікування спостерігаються і в підгрупі пацієнтів із експресією PD-L1 1% та більше.

Таким чином, на підставі значних перевагах у виживаності в популяції із експресією PD-L1 1% та більше, та враховуючи достатній профіль безпеки пембролізумабу порівняно із хіміотерапією, пембролізумаб є прийнятним варіантом лікування для пацієнтів з пухлинами які експресують PD-L1 1% та більше.

Середня загальна виживаність в групі пацієнтів, що лікувалися пембролізумабом в підгрупі з експресією PD-L1 50% та більше в числовому значенні є нижчою ніж це було показано в дослідженні KEYNOTE-024. Зазначимо, що в дослідженні KEYNOTE-024 пацієнтами переважно були жителі Північної Америки та західної Європи, лише 13% були залучені із східної Азії. В нашому дослідженні пацієнти були представлені більш рівномірно щодо регіонів планети.

Пембролізумаб не подовжив значно безрецидивний період лікування в підгрупі пацієнтів із експресією PD-L1 50% та більше. Помічено, що в дослідженнях імунотерапевтичних препаратів тривалість безрецидивного періоду не завжди корелює із подовженням періоду загальної виживаності. Проте, цей результат був для нас дещо неочікуваним, особливо у порівнянні із результатами дослідження KEYNOTE-024, де була отримана позитивна кореляція між тривалістю безрецидивного періоду та загальною виживаністю у пацієнтів із експресією PD-L1 50% та більше.

В порівнянні із пембролізумабом в нашому дослідженні препарат імунотерапевтичної дії ніволумаб, який є інгібітором PD-1, не покращив загальну виживаність порівняно із хіміотерапією, що зазначено в дослідженні 3 фази CheckMate 026, в підгрупі пацієнтів з пухлинами, які експресують PD-L1.

Як висновок, перша лінія монотерапії пембролізумабом значно покращує загальну виживаність та є менш токсичною у порівнянні із хіміотерапією для пацієнтів із локально розповсюдженим або метастатичним немілоклітинним раком легень, у яких не виявлено EGFR мутацій та ALK транслокацій, та у яких пухлина експресує PD-L1 як мінімум в 1% клітин. Може бути запропонована як стандартне лікування в першій лінії в зазначеній групі пацієнтів.

У свою чергу важливість встановлення статусу PD-1 та PD-L1, за умови локалізації злоякісного процесу в нирці, також несе провідну роль у виборі лікувальної тактики. Грунтуючись на цьому, результатами 3 фази дослідження лікування пацієнтів із раніше нелікованим розповсюдженим раком нирки є зниження на 47% ризику смерті в групі пембролізумаб+аксітініб та на 31% нижчий ризик прогресування хвороби чи смерті в групі із сунітінібом. Частка об'єктивної відповіді на 23,6% вище в групі пембролізумаб+аксітініб в порівнянні із групою сунітінібу. Зазначено, що переваги лікування в групі пембролізумаб+аксітініб, спостерігалися в усіх підгрупах щодо категорій ризику та експресії PD-L1 в пухлині.



Результати інших клінічних досліджень також вказують, що комбінована терапія інгібіторами імунних точок має протипухлинний ефект в якості першої лінії лікування пацієнтів із розповсюдженим раком нирки. Серед пацієнтів, які мають неблагоприємний або середній ступінь ризику комбінація інгібітору PD-1 ніволумабу та цитотоксичного T-лімфоцит асоційованого інгібітора білка 4 іпіліумабу приводить до довшого періоду загальної виживаності та вищого рівня об'єктивної відповіді на лікування в порівнянні із сунітінібом. Ніволумаб + іпіліумаб привели до повної регресії у 9% пацієнтів.

Комбінація PD-L1 інгібітора авелумабу з аксітінібом результується в довшому безрецидивному періоді та вищому рівні об'єктивної відповіді порівняно із сунітінібом у раніше не лікованих пацієнтів з експресією PD-L1.

Профілі безпеки в обох групах не відрізнялися від очікуваних, проте частота побічних явищ 3 ступеню та вище в групі пембролізумаб + аксітініб виявилася вищою стосовно рівнів печінкових ензимів порівняно з відомими профілями, коли препарати застосовувалися окремо. Частота виведення пацієнтів із лікування була вищою в групі пембролізумаб + аксітініб порівняно із групою сунітінібу. Вище очікуваного виявилась частота проявів гіпер- та гіпотиреоїдизму в першій групі.

Як висновок, результати KEYNOTE-426 показали, що серед пацієнтів із раніше не лікованим розповсюдженим раком нирки лікування комбінацією пембролізумаб + аксітініб приводить до значно довшої загальної виживаності та безрецидивного періоду, вищого рівня об'єктивної відповіді на лікування у порівнянні із групою лікування сунітінібом. Профіль токсичності щодо підвищення рівня печінкових ензимів в групі пембролізумаб + аксітініб потребує подальшого вивчення. Переваги лікування в групі пембролізумаб + аксітініб спостерігалися в усіх зазначених підгрупах стосовно категорії ризиків та PD-L1 експресії в пухлині.

У свою чергу, аналіз результатів морфологічних та молекулярно-генетичних досліджень раку передміхурової залози дозволив сформува

ідею поведінки пухлинного процесу з наступним їх узагальненням. Так, Середній вік пацієнтів з раком передміхурової залози в експериментальній та контрольній групах становив  $70,23 \pm 1,71$  та  $68,27 \pm 1,27$  років відповідно ( $p > 0,05$ ). Всі зразки раку передміхурової залози були представлені ацинарною аденокарциномою.

Під час морфологічного дослідження тканини раку передміхурової залози експериментальної групи виявлялася структурна трансформація тканини раком передміхурової залози у вигляді кістозного розширення залоз, затримки секрету, пов'язаної з наявністю ІлВ амілоїдного та мінерального походження. Були також виявлені ознаки хронічного запалення, механічної епітеліального епітеліального компонента залоз, наявності клітинного детриту в просвіті, мікророзломів залоз та їх деформації. Також спостерігали ріст фіброзних волокон, поодинокі крововиливи та помірний набряк у навколишніх тканинах.

Неопластична тканина зразків контрольної групи характеризувалася відсутністю ІлВ. Також відмічалася зменшення застійних явищ у залозах та протоках, нижча травматизація залозистого епітелію та нижча інтенсивність запальної інфільтрації.

Зразки раку передміхурової залози підгрупи E2 характеризувались чіткою структурованістю епітеліального компонента з утворенням добре розпізнаних залоз та псевдогландулярних структур з накопиченням внутрішньолюмінального секрету. Вторинні зміни пухлинної тканини проявлялися у вигляді помірного набряку та фіброзу.

Підгрупу E3 представили зразки тканин раку передміхурової залози із спрощеною гістоархітектонікою та морфологічною структурою. Ракові клітини розташовувались у вигляді неорганізованих мас, гнізд, ланцюгів, шарів та поодиноких клітин. Спрощення пухлинної тканини раку передміхурової залози проявлялося у вигляді мономорфної структури пухлинних клітин зі значним зменшенням кількості залозистих структур.

Спостерігалися вторинні зміни, зокрема муцинозна трансформація та крововиливи.

Зразки неопластичної тканини підгрупи K2 характеризувалися зрілістю атипових залозистих структур, відсутністю ІлВ та застоєм секрету в залозисто-протоковій системі. Структура зразків раку передміхурової залози підгрупи K3 відповідала морфологічній структурі підгрупи E3, окрім присутності ІлВ та інтенсивності запальної інфільтрації.

Під час дослідження впливу андрогенів на тканини раку передміхурової залози обидві групи виявили високу чутливість до цих гормонів у абсолютній більшості досліджуваних зразків (виявлено 1 зразок з негативною реакцією у підгрупі E3). Достовірної різниці між експресією AR між групами виявлено не було (Рис. 10 та 11). Раніше повідомлялося про зв'язок між експресією AR та функціональною активністю неопластичної тканини та оцінкою за шкалою Глісона [38]. Однак наш аналіз впливу оцінки ступеня диференціювання пухлини на рівень експресії AR показав відсутність будь-якої суттєвої різниці в показниках експериментальної та контрольної груп. За словами Джеймса Л. Молера (2008), зміни в генах, що кодують рецептори андрогенів, а також конформаційні зміни в структурі самого AR мають обмежену роль у прогресуванні раку передміхурової залози та розвитку кастраційнорезистентного раку передміхурової залози. Було також встановлено, що експресія AR не залежить від ступеня диференціювання пухлини [39].

Система проапоптотичних білків p53 і Вах відіграє важливу роль в апоптотичних процесах. p53-залежний апоптоз клітин відбувається опосередковано шляхом активації білка Вах (родина білків Bcl-2) [40]. Достовірно значуща різниця у експресії білка p53 була виявлена між підгрупами E2 та E3 з більш високою його експресією у низькодиференційованому раку передміхурової залози (Рис. 11). Ці дані можуть вказувати на велику залежність між експресією p53 та оцінкою шкалою Глісона, та відсутність кореляції з присутністю ІлВ. Ці результати

повністю підтверджують результати дослідження, проведеного Дж. Томасом та ін. (1993), в якому вони виявили, що висока експресія p53 притаманна переважно пухлинам високого ступеня злоякісності і супроводжується погіршенням прогнозу захворювання та зменшенням тривалості життя пацієнтів [41].

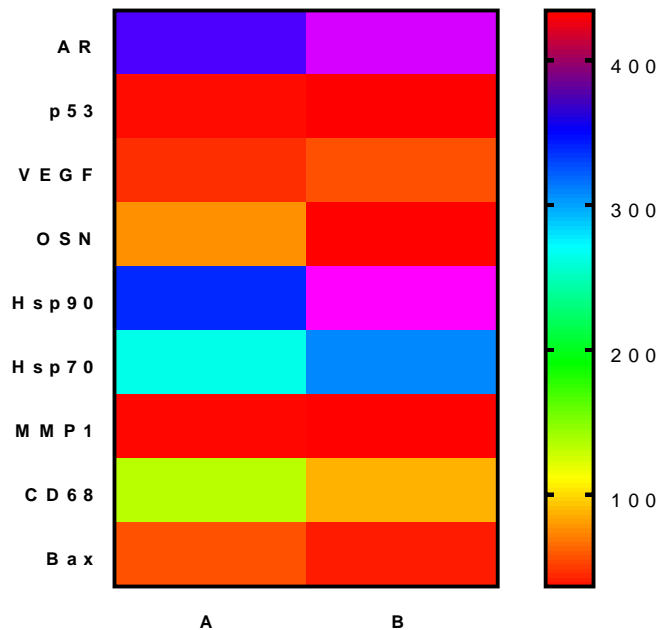


Рисунок 10 – Середні рівні експресії AR, p53, VEGF, OSN, Hsp90, Hsp70, MMP1, CD68 та Bax у тканині раку передміхурової залози експериментальної (А) та контрольної (В) груп.

Аналіз експресії Bax показав наявність достовірної різниці між експериментальною та контрольною групами. Але статистично значущої різниці в результатах експресії Bax між підгрупами E2 і E3, а також C2 і C3 виявлено не було. Це свідчить про те, що ІлВ стимулюють утворення проапоптотичних білків та сприяють апоптозу, тоді як роль ступеню диференціювання пухлини в експресії Bax не була встановлена (рис. 5). Однак раніше, зокрема у дослідження Лі-Ян Хор (2006), вказувалося на пряму залежність експресії Bax від оцінки пухлини за шкалою Глісона та

зробив висновок, що більш агресивні пухлини мають підвищену експресію Вах [42,43].

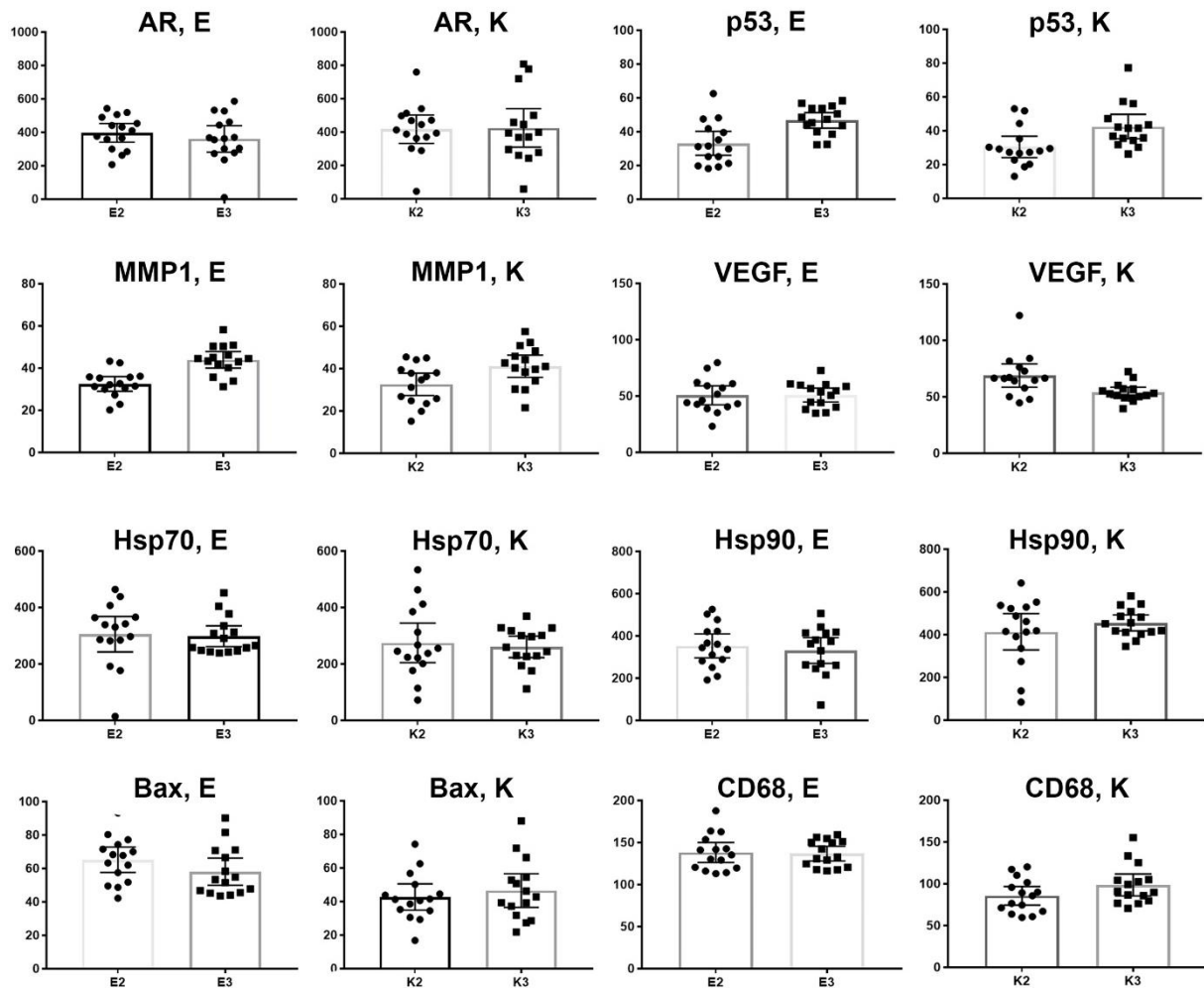


Рисунок 11 – Статистичне дослідження експресії AR, p53, MMP1, VEGF, Hsp70, Hsp90, Вах, CD68 та OSN у тканині раку передміхурової залози експериментальної та контрольної груп в залежності від ступеня диференціювання. Стовпчик вказує на середнє значення показника, бар – 95% інтервал достовірності.

Раніше була встановлена роль Hsp70 та Hsp90 у процесах пригніченні апоптозу шляхом інгібування проапоптотичних протеїнів (зокрема, каспаз) [44]. У нашому дослідженні було виявлено статистично значущу різницю між експресією Hsp90 в експериментальній та контрольній групах (Рис. 10). Наявність Hsp90 у структурі СА вказує на їх можливу участь у формуванні цих включень. Кореляції між оцінкою за шкалою Глісона та експресією

Hsp90 виявлено не було (Рис. 11). Під час дослідження експресії Hsp70 не було виявлено достовірної різниці між експериментальною та контрольною групами, підгрупами E2 та E3 та C2 та C3 відповідно. Однак спостерігалася тенденція до підвищення експресії даного протеїну у тканині раку передміхурової залози з ІлВ. Це вказує на те, що ні оцінка за шкалою Глісона, ні наявність ІлВ не впливають на експресію Hsp70 (Рис. 10 і 11). Хоча більшість досліджень вказують на незначну роль високомолекулярних білків теплового шоку в процесах канцерогенезу [45], виявлено їх зв'язок з ризиком розвитку метастатичного раку молочної залози [46]. Існує також зв'язок між p53 і Hsp70 (інгібує каспаза-9-залежний мітохондріальний апоптоз, стабілізує структуру мутантного білка p53 і стимулює проліферацію клітин). Hsp70 пов'язаний з більш агресивним перебігом захворювання і є несприятливим прогностичним фактором [47]. Тим часом залежність експресії Hsp90 від наявності ІлВ є невивченою. Однак було встановлено, що підвищений рівень позаклітинного Hsp90 збільшує клітинну міграцію, інвазивний потенціал клітин раку передміхурової залози [48].

Експресія MMP-1 пов'язана з інвазією пухлинних клітин та розвитком метастазів. Ось чому експресія MMP-1 у пухлинній тканині вважається прогностично-несприятливим фактором розвитку раку передміхурової залози [49]. Нами не було встановлено статистично значущої різниці експресії MMP-1 між експериментальною та контрольною групами (Рис. 10). Однак ми виявили вплив ступеню диференціювання раку передміхурової залози на експресію MMP-1 як в експериментальній, так і в контрольній групах. Більше того, значно більш високий рівень експресії MMP-1 був виявлений у раку передміхурової залози з високим ступенем злоякісності (E3 та C3) (Рис. 11). Ці результати підтверджуються результатами, отриманими д-р Джонг та ін. (2008), за якими було вказано на кореляцію між експресією MMP-1 та стадією захворювання [50]. MMP-1, або колагеназа 1, бере участь у руйнуванні сполучнотканинної складової стромы пухлини і створює умови для розвитку метастазів раку передміхурової залози, що пояснює достовірно

вищі рівні експресії MMP-1 у низькодиференційованих пухлинах обох груп [51].

Підвищена експресія VEGF пухлинною тканиною вважається прогностично несприятливим фактором [52]. Наші результати свідчать про достовірно вищу експресію VEGF у зразках пухлинної тканини контрольної групи (Рис. 10). Також було встановлено підвищену експресію VEGF в підгрупі С2 порівняно з підгрупою С3. Це може свідчити про негативний вплив ІлВ на процеси васкуляризації пухлинної тканини, хоча більшість досліджень свідчать про посилення експресії VEGF у раку передміхурової залози високого ступеню злоякісності [53,54].

Нами було встановлено достовірно вищу кількість CD68-позитивних клітин в зразках раку передміхурової залози експериментальної групи (Рис. 10). В той же час, зв'язку між ступенем диференціювання пухлини та кількістю активованих макрофагів встановлено не було. Це вказує на те, ступінь диференціювання раку передміхурової залози не впливає на інфільтрацію пухлинної тканини макрофагами. М. Ланчотті та ін. (2014) встановили, що збільшена кількість пухлинно-активованих макрофагів пов'язана з екстракапсулярною інвазією та прогресуванням раку передміхурової залози [55]. Таким чином, значна кількість мононуклеарних фагоцитів у тканинах передміхурової залози експериментальної групи свідчить про вплив ІлВ у розвитку хронічного запалення.

OSN бере участь у процесах біомінералізації та ремоделювання позаклітинного матриксу, а також може виступати в ролі пухлинного інгібітора. Рівень його експресії залежить від ступеню диференціювання епітеліального та стромального компонентів різних типів пухлини [56]. Під час дослідження ми виявили достовірно вищий рівень експресії OSN у зразках раку передміхурової залози експериментальної групи (Рис. 10). Це може бути обумовлено його участю у формуванні та рості простатичних конкрементів. Також спостерігалася достовірно вища експресія OSN у тканині раку передміхурової залози помірного ступеня диференціювання

обох груп ( $p < 0,05$ ) (Рис. 11). За даними К. Якоб та ін. (1999), OSN специфічно підвищує активність матриксних металопротеїназ і сприяє міграції неопластичних клітин та розвитку кісткових метастазів [57]. Саме тому ми вважаємо, що підвищена експресія OSN пов'язана з присутністю ІЛВ та підвищеною експресією MMP1. Поєднання цих факторів створює умови для розвитку метастазів до кісткової тканини.

Наявність у пухлинах рецепторів стероїдних гормонів – важливий показник для застосування гормонотерапії [58]. У свою чергу стероїд-негативні пухлини мають пряме протипоказання до гормонотерапії. У літературі зустрічаються поодинокі повідомлення про використання гормональних препаратів в комбінації з цитостатиками при лікуванні неоплазій маткових труб [59–61]. У нашому дослідженні виявлено, що зі збільшенням клітинної анаплазії та значному розповсюдженні пухлинного процесу зменшується кількість стероїд-позитивних клітин і зростає частка стероїд-негативних новоутворень маткових труб. При прогресуванні пухлинного процесу виникає функціональне та рецепторне спрощення пухлинних клітин і кількість рецепторів до стероїдних гормонів знижується (підвищення ступеня автономності пухлини).

Крім того, при метастазуванні неоплазії в лімфатичні вузли експресія ER та PR у ракових клітинах була значно меншою, ніж у випадках без наявності лімфогенного метастазування ( $p < 0,001$ ). Аналізуючи вищезазначене, наявність рецепторів стероїдних гормонів у тканині САкМТ є важливою прогностичною біологічною характеристикою цієї неоплазії та може визначати перебіг захворювання, оскільки зниження або втрата експресії як ER, так і PR у пухлинах маткових труб асоціюється з інвазією, метастазуванням і, як наслідок, несприятливим перебігом захворювання.

Результати нашого дослідження демонструють, що гіперекспресія HER2/neu не характерна для первинного раку маткових труб, враховуючи майже повну її відсутність у пухлинній тканині. На противагу нашому дослідженню, надлишкова експресія HER2/neu у непластичній тканині



маткових труб була продемонстрована деякими авторами в 25,6% [62], 31% [63] та 89% [64] випадках САкМТ. Згідно наших досліджень, визначення даного онкопротеїну ми не можемо рекомендувати при прогнозуванні перебігу злякисного процесу.

Як показують результати нашого дослідження, середнє значення Кі-67 становило  $55.0 \pm 12.2\%$ . Частіше траплялися пухлини в маткових труб з індексом проліферації більше 60% (54.5%). Аналізуючи вищезазначене, можна стверджувати, що первинного раку маткових труб є пухлиною з високою проліферативною активністю, що свідчить про надзвичайно агресивний перебіг захворювання.

За результатами наших досліджень встановлено, що у 80.3% випадків САкМТ є p53-позитивною пухлиною. Крім того, мутації p53 наростали зі ступенем поширеності пухлинного процесу. На противагу p53, у 72.4% випадків експресія антиапоптотичного білка bcl-2 спостерігалася на ранніх стадіях неопластичного процесу. Ймовірно, що у пухлинній клітині блокування процесів апоптозу відбувається на одному з двох етапів росту пухлини за різними механізмами: на ранніх стадіях активується антиапоптотичний bcl-2, на пізніх стадіях виникають мутації в гені *TP53*, що призводить до втрати функціональних властивостей білка, який він кодує. Гіперекспресія bcl-2 пояснює більш інтенсивне інгібування апоптозу і, як наслідок, повинна характеризуватися більш агресивною поведінкою пухлини. Завдяки нашим результатам можна зробити висновок, що гіперекспресія bcl-2 – позитивна прогностична ознака при первинному раку маткових труб. Це, ймовірно, пояснюється поєднанням експресії bcl-2 та рецепторів стероїдних гормонів, оскільки ген *Bcl-2* є естроген-залежним геном [65,66].

Таким чином, у нашій роботі в результаті комплексного морфологічного дослідження раку маткових труб одержані дані, які потрібно враховувати при визначенні стратегії та плануванні індивідуальної тактики лікування хворих на злякисні пухлини маткових труб (використання

антигормональної терапії при позитивному гормональному статусі пухлини, використання ад'ювантної хіміотерапії при значеннях проапоптотичного білка p53 > 10% та високій проліферативній активності ракових клітин > 60%, а також використання анти-VEGF-терапії при високому ангіогенному потенціалі неоплазій).

Формулюючи загальну схему отриманих результатів можна сказати, що використання рідинної біопсії значно покращить як ефективність діагностики злоякісних новоутворень різноманітних локалізацій, так і індивідуальний терапевтичний підхід до пацієнтів (висвітлено у наших результатах). Однак, для повного освоєння даної методики необхідно стандартизувати результати гістологічного та імуногістологічного досліджень (висвітлено у наших результатах) тканинної біопсії з наступною кореляцією з рівнем вільно циркулюючих пухлинних ДНК в крові. Впровадження даної методики в практику лікаря значно покращить ранню діагностику неоплазії, дозволить індивідуалізувати терапію та знизити витрати лікування, що в комплексі сприятиме зростанню загальною виживаності хворих.

## ВИСНОВКИ

1. Особливості диференційної діагностики доброякісних та злоякісних пухлин легень мають принципове значення для встановлення остаточного клінічного діагнозу для пацієнтів із новоутвореннями легень й узгодження терапевтичної тактики в кожному окремому випадку. Визначення експресії PD-L1 є важливим етапом в діагностиці раку легень, що знаходить своє відображення в виборі ефективного препарату для лікування. Було встановлено взаємозв'язок між більш високим рівнем експресії PD-L1 та кращими результатами лікування для монотерапії пембролізумабом.

2. Встановлено, що терапевтичне лікування світлоклітинного раку нирки за умов позитивної експресії PD-L1 зменшує ризик прогресування захворювання та одночасно покращує відсоток виживаності, а найкращим вибором для лікування даної патології є комбінація пембролізумаб та аксітініб.

3. У зразках раку передміхурової залози виявлена висока експресія AR, котра не залежала від ступеню диференціювання та присутності інтралюмінальних включень. Рівень експресії VEGF вищий у більш диференційованих пухлинах, що може свідчити про пригнічуючий вплив інтралюмінальних включень на процеси васкуляризації пухлинної тканини. Білок теплового шоку Hsp90 має достовірно нижчий рівень експресії у тканині раку передміхурової залози з інтралюмінальними включеннями, що може бути обумовлене його депонуванням у структурі *corroga amylosea*. Експресія білка теплового шоку Hsp70 не залежала від присутності інтралюмінальних включень та ступеню диференціювання пухлини.

4. Зі зниженням ступеню диференціації раку передміхурової залози підвищується рівень експресії прогностичних маркерів p53, OSN, MMP1, клітин макрофагального ряду CD68 та проапоптотичного протеїну Bax (за присутності інтралюмінальних включень).

5. Неопластичні клітини аденокарциноми первинного раку маткових труб мають високі показники експресії рецепторів до естрогену (83.3%), прогестерону (62.1%), Ki-67 (середнє значення  $55.0 \pm 12.2\%$ ), p53 (80.3%), bcl-2 (81,8%) та VEGF (87.9%), які мають взаємозалежні зв'язки та впливають на агресивність перебігу пухлини.

6. Використання комплексного морфологічного (гістологічного та імуногістохімічного) дослідження післяопераційного матеріалу дозволяє оцінити ступінь злякисності та поширеності пухлинного процесу, що дозволяє підібрати адекватну лікувальну тактику у кожному окремому випадку.

**ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ**

1. Aynaci O., Canyilmaz E., Serdar L. K. (2016) Survival and prognostic factors in limited stage small cell lung cancer: A retrospective study from northeast Turkey. *Cancer Res.*, 12(1):238-243. doi:10.4103/0973-1482.151446
2. Cronin KA, Lake AJ, Scott S, Sherman RL, Noone AM, Howlader N et al. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, part I: National cancer statistics. *Cancer* 2018; 124(13): 2785-2800.
3. Sfanos KS, De Marzo AM. Prostate cancer and inflammation: the evidence. *Histopathology* 2012; 60: 199-215.
4. Shoskes DA, Lee CT, Murphy D, Kefer J, Wood HM. Incidence and Significance of Prostatic Stones in Men with Chronic Prostatitis/Chronic Pelvic Pain Syndrome. *Urology* 2007 Aug; 70(2): 235-8.
5. Torkko KC, Wilson RS, Smith EE, Kusek JW, van Bokhoven A, Lucia MS. Prostate Biopsy Markers of Inflammation are Associated with Risk of Clinical Progression of Benign Prostatic Hyperplasia: Findings from the MTOPS Study. *J Urol* 2015 Aug; 194(2): 454-61.
6. Roberts E, Cossigny DAF, Quan GMY. The role of vascular endothelial growth factor in metastatic prostate cancer to the skeleton. *Prostate cancer* 2013; 2013: 418340.
7. Chatterjee S, Burns TF. Targeting Heat Shock Proteins in Cancer: A Promising Therapeutic Approach. *Int J Mol Sci* 2017 Sep 15; 18(9): E1978.
8. Pulukuri SM, Rao JS. Matrix metalloproteinase-1 promotes prostate tumor growth and metastasis. *Int J oncol* 2008 Apr; 32(4): 757-65.
9. Johnson MI, Robinson MC, Marsh C, Robson CN, Neal DE, Hamdy FC. Expression of Bcl-2, Bax, and p53 in high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and localized prostate cancer: relationship with apoptosis and proliferation. *Prostate* 1998 Dec 1; 37(4): 223-9.

10. Fujita K, Nonomura N. Role of Androgen Receptor in Prostate Cancer: A Review. *World J Mens Health* 2018 Sep; 10(3): e32
11. Epstein JI, Zelefsky MJ, Sjoberg DD, Nelson JB, Egevad L, Magi-Galluzzi C et al. A contemporary prostate cancer grading system: a validated alternative to the Gleason score. *Eur Urol* 2016; 69(3): 428-35.
12. Guo X, Zhang C, Guo Q, Xu Y, Feng G, Li L et al. The homogeneous and heterogeneous risk factors for the morbidity and prognosis of bone metastasis in patients with prostate cancer. *Cancer Manag Res* 2018; 10: 1639-1646.
13. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011 Mar-Apr;61(2):69–90.
14. Azodi M, Langer A, Jenison EL. Primary fallopian tube carcinoma with isolated torsion of involved tube. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2000;21(4):364–7.
15. Singhal P, Odunsi K, Rodabaugh K, Driscoll D, Lele S. Primary fallopian tube carcinoma: a retrospective clinicopathologic study. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2006;27(1):16–8.
16. Kalampokas E, Sofoudis C, Boutas I, Kalampokas T, Tourountous I. Primary fallopian tube carcinoma: a case report and mini-review of the literature. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2014;35(5):595–6.
17. Riska A, Leminen A. Updating on primary fallopian tube carcinoma. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2007;86(12):1419–26.
18. Callahan MJ, Crum CP, Medeiros F, Kindelberger DW, Elvin JA, Garber JE, Feltmate CM, Berkowitz RS, Muto MG. Primary fallopian tube malignancies in BRCA-positive women undergoing surgery for ovarian cancer risk reduction. *J Clin Oncol*. 2007 Sep 1;25(25):3985–90.
19. Kalampokas E, Kalampokas T, Tourountous I. Primary fallopian tube carcinoma. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2013 Jul;169(2):155–61.
20. Kessler M, Fotopoulou C, Meyer T. The molecular fingerprint of high grade serous ovarian cancer reflects its fallopian tube origin. *Int J Mol Sci*. 2013 Mar 25;14(4):6571–96.

21. Reade CJ, McVey RM, Tone AA, Finlayson SJ, McAlpine JN, Fung-Kee-Fung M, Ferguson SE. The fallopian tube as the origin of high grade serous ovarian cancer: review of a paradigm shift. *J Obstet Gynaecol Can.* 2014 Feb;36(2):133–40.
22. Kim J, Coffey DM, Creighton CJ, Yu Z, Hawkins SM, Matzuk MM. High-grade serous ovarian cancer arises from fallopian tube in a mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Mar 6;109(10):3921–6.
23. Przybycin CG, Kurman RJ, Ronnett BM, Shih IeM, Vang R. Are all pelvic (nonuterine) serous carcinomas of tubal origin? *Am J Surg Pathol.* 2010 Oct;34(10):1407–16.
24. Riska A., Leminen A., Pukkala E. Sociodemographic determinants of incidence of primary fallopian tube carcinoma, Finland 1953-97. *Int J Cancer.* 2003 May 1;104(5):643–5.
25. Potapov S, Sidorenko R, Galata D, Stratiy N, Gargin V. Peculiarities of catenin activity in the embryonal testicular carcinoma. *Georgian Med News.* 2016 Dec;(261):68-73.
26. Romaniuk A, Lyndin M, Smiyanov V, Sikora V, Rieznik A, Kuzenko Y, et al. Primary multiple tumor with affection of the thyroid gland, uterus, urinary bladder, mammary gland and other organs. *Pathol Res Pract.* 2017 May;213(5):574-579
27. . Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin.* 2016; 66(1):7-30.
28. . Мурзин Я.Ю. Современные аспекты инвазивной диагностики очаговых образований лёгких: автореф. Дис. канд. мед. наук. Москва. 2012. 28с.
29. Дужий І.Д., Кравець О.В., Гресько І.Я., Яшукова Є.В. Карциноїди і карциноїдний синдром у фтизіопульмонології. Туберкульоз, легеневі хвороби, ВІЛ-інфекція. 2014;3(18):60-4.

30. . Bagheri R, Haghi SZ, Dalouee MN, Nasiri Z, Rajabnejad A. Evaluation of the results of surgery treatment in patients with benign lung tumors. *Lung India*. 2015 Jan-Feb; 32(1): 29–33. doi: 10.4103/0970-2113.148436

31. . Microsvit. Класифікація пухлин. [Інтернет].[оновлено 2016 січ.8; цитовано 2019]. Доступно на: <http://microsvit.info/klasyfikatsiya-puhlyn/>

32. Masahiro Kitada, Shunsuke Yasuda, Kei Ishibashi, Satoshi Hayashi, Yoshinari Matuda, Yoshinobu Ohsakiand, та ін. Leiomyoma of the Trachea: a case report. *J CardiothoracSurg*. 2015; 10: 78.

33. Benign Metastasizing Leiomyoma of Lung. [Internet]. DoveMed Editorial Board: Benign Metastasizing Leiomyoma of Lung; 2017 [updated 2017 April 22; cited 2017Apr 22]. Available from:<http://www.dovemed.com/diseases-conditions/benign-metastasizing-leiomyoma-lung/>

34. Park JS, Lee M, Kim HK, Choi YS, Kim K, Kim J et al. Primary leiomyoma of the trachea, bronchus, and pulmonary parenchyma--a single-institutional experience. *Eur J CardiothoracSurg*. 2012;41(1):41-5.

35. Jordan Miller, Melina Shoni, Charles Siegert, Abraham Lebenthal, John Godleski, Ciaran McNamee. Benign Metastasizing Leiomyomas to the Lungs: An Institutional Case Series and a Review of the Recent Literature. 2016;101(1): 253-8

36. Ліскіна І.В., Шпак О.І., Загаба Л.М., Бичковський В.Б., Яцина М.Ф. Ефективність гістологічного та цитологічного дослідження при різних ендоскопічних методах забору біопсій у хворих із фтизіо-пульмонологічною патологією. *Запорізький медичний журнал*. 2016;1(94):53–8 Liskina I.V., Shpak O.I., Zahaba L.M., Bychkovs'kyu V.B., Yatsyna M.F. Efektyvnist' histolohichnoho ta tsytolohichnoho doslidzhennya pryryznykh endoskopichnykh metodakh zaboru biopsiyu khvorykh iz ftyzio-pul'monolohichnoyu patolohiyeyu. *Zaporiz'kyu medychnyy zhurnal*. 2016;1(94): 53–8 [In Ukrainian].

37. W. J. Heerink, G. H. deBock, G. J. deJonge, H. J. M. Groen, R. Vliegthart, M.Oudkerk. Complication rates of CT-guided transthoracic lung biopsy: meta-analysis. *EurRadiol* 2017;27(1): 138–48.



38. Banerjee P, Banerjee S, Brown T, Zirkin B. Androgen action in prostate function and disease. *Am J Clin Exp Urol* 2018; 6(2): 62-77.
39. Mohler JL. A role for the androgen-receptor in clinically localized and advanced prostate cancer. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2008 Apr; 22(2): 357-72.
40. Levesque A, Eastman A. p53-based cancer therapies: Is defective p53 the Achilles heel of the tumor? *Carcinogenesis* 2007; 28(1): 13-20.
41. Thomas DJ, Robinson M, King P, Hasan T, Charlton R, Martin J, et al. p53 expression and clinical outcome in prostate cancer. *Br J Urol* 1993 Nov; 72(5 Pt2): 778-81.
42. Khor LY, Desilvio M, Li R, McDonnell TJ, Hammond ME, Sause WT, et al. Bcl-2 and bax expression and prostate cancer outcome in men treated with radiotherapy in Radiation Therapy Oncology Group protocol 86-10. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006 Sep 1; 66(1): 25-30.
43. Khor LY, Moughan J, Al-Saleem T, Hammond EH, Venkatesan V, Rosenthal SA, et al. Bcl-2 and Bax expression predict prostate cancer outcome in men treated with androgen deprivation and radiotherapy on radiation therapy oncology group protocol 92-02. *Clin Cancer Res* 2007 Jun 15; 13(12): 3585-90.
44. Jindala DG, Jindal V, Joshia S, Bhojiac I, Chawdhryc A. Heat shock proteins in pathology: a review. *Journal of Pierre Fauchard Academy (India Section)* 2016; 30(3-4): 84-7.
45. Kurahashi T, Miyake H, Hara I, Fujisawa M. Expression of major heat shock proteins in prostate cancer: correlation with clinicopathological outcomes in patients undergoing radical prostatectomy. *J Urol* 2007 Feb; 177(2): 757-61.
46. Cornford PA, Dodson AR, Parsons KF, Desmond AD, Woolfenden A, Fordham M, et al. Heat shock protein expression independently predicts clinical outcome in prostate cancer. *Cancer Res* 2000 Dec 15; 60(24): 7099-105.
47. Leuret T, Watson RW, Fitzpatrick JM. Heat shock proteins: their role in urological tumors. *J Urol* 2003 Jan; 169(1): 338-46.

48. Nolan KD, Kaur J, Isaacs JS. Secreted heat shock protein 90 promotes prostate cancer stem cell heterogeneity. *Oncotarget* 2017 Mar 21; 8(12): 19323-41.
49. Zhang C, Song X, Zhu M, Shi S, Li M, Jin L et al. Association between MMP1-1607 1G>2G polymorphism and head and neck cancer risk: a meta-analysis. *PloS One* 2013; 8(2): 285-93.
50. Zhong WD, Han ZD, He HC, Bi XC, Dai QS, Zhu G, et al. CD147, MMP-1, MMP-2 and MMP-9 protein expression as significant prognostic factors in human prostate cancer. *Oncology* 2008; 75(3-4): 230-6.
51. Pulukuri SM, Rao JS. Matrix metalloproteinase-1 promotes prostate tumor growth and metastasis. *Int J Oncol* 2008 Apr; 32(4): 757-65.
52. Kervancioglu E, Kosan M, Erinanc H, Gonulalan U, Oguzulgen AI, Coskun EZ et al. Predictive values of vascular endothelial growth factor and microvessel-density levels in initial biopsy for prostate cancer. *Med Sci* 2016; 32(2): 74-9.
53. Gautam KA, Singh AN, Srivastav AN, Sankhwar SN. Angiogenesis in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia assessed by VEGF and CD-34 IHC: A comparative clinico-pathological study. *Afr J Urol* 2018 June; 24(2): 98-103.
54. Weber DC, Tille JC, Combescure C, Egger JF, Laouti M, Hammad K, et al. The prognostic value of expression of HIF1 $\alpha$ , EGFR and VEGF-A, in localized prostate cancer for intermediate- and high-risk patients treated with radiation therapy with or without androgen deprivation therapy. *Radiat Oncol* 2012; 7: 66.
55. Lanciotti M, Masieri L, Raspollini MR, Minervini A, Mari A, Comito G, et al. The Role of M1 and M2 Macrophages in Prostate Cancer in relation to Extracapsular Tumor Extension and Biochemical Recurrence after Radical Prostatectomy. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 486798.
56. Chang DK, Jamiesonaf NB, Grimmondag SM. Stratified Medicine for Pancreatic Cancer. In: Padmanabhan S, editor. *Handbook of Pharmacogenomics and Stratified Medicine*. London, UK: Academic Press; 2014. p. 807-14.

57. Jacob K, Webber M, Benayahu D, Kleinman HK. Osteonectin promotes prostate cancer cell migration and invasion: a possible mechanism for metastasis to bone. *Cancer Res* 1999 Sep 1; 59(17): 4453-7.

58. Farooq S., Tasleem R., Nazir N., Reshi R., Hassan Z. Histopathological pattern of ovarian neoplasms and estrogen and progesterone receptor expression in primary epithelial tumours and their histopathological correlation. *Int. J. Cur. Res. Rev.* 2013;5( 21):70–77.

59. Rose PG , Piver MS, Tsukada Y. Fallopian tube cancer. The Roswell Park experience. *Cancer.* 1990 Dec 15;66(12):2661–7.

60. Rosen AC, Reiner A, Klein M, Lahousen M, Graf AH, Vavra N, Auerbach L, Vorbeck F, Rosen HR. Prognostic factors in primary fallopian tube carcinoma. Austrian Cooperative Study Group for Fallopian Tube Carcinoma. *Gynecol Oncol.* 1994 Jun;53(3):307–13.

61. Thomas C, Gustafsson JÅ. The different roles of ER subtypes in cancer biology and therapy. *Nat Rev Cancer.* 2011 Jul 22;11(8):597–608.

62. Lacy MQ, Hartmann LC, Keeney GL, Cha SC, Wieand HS, Podratz KC, Roche PC. c-erbB-2 and p53 expression in fallopian tube carcinoma. *Cancer.* 1995 Jun 15;75(12):2891–6.

63. Isabel Alvarado-Cabrero, Takako Kiyokawa, Patricia Piña, Raquel Valencia-Cedillo, Héctor Santiago-Payán, Simona Stolnicu. HER2/neu, p53, MIB1 and PAX8 immunoexpression in primary serous fallopian tube carcinomas. *Rev Esp Patol* 2016;49:219–25.

64. Chung TK, Cheung TH, To KF, Wong YF. Overexpression of p53 and HER-2/neu and c-myc in primary fallopian tube carcinoma. *Gynecol Obstet Invest.* 2000;49:47–51.

65. Dawson S-J, Makretsov N, Blows F M, Driver K E, Provenzano E, Le J Quesne, Baglietto L, Severi G, Giles G G, McLean C A, Callagy G, Green A R, Ellis I, Gelmon K, Turashvili G, Leung S, Aparicio S, Huntsman D, Caldas C, Pharoah P. BCL2 in breast cancer: a favourable prognostic marker across

molecular subtypes and independent of adjuvant therapy received. *Br J Cancer*. 2010 Aug 24; 103(5):668–675.

66. Romaniuk A, Lyndin M. Immune microenvironment as a factor of breast cancer progression. *Diagn Pathol*. 2015 Jun 26;10:79.