

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»
(остаточний)

Науковий керівник
канд.мед наук, доцент

І.О. Винниченко

2020

Рукопис закінчено 22 грудня 2020 р.

Результати роботи розглянуто науковою радою СумДУ, протокол від
23.12.2020 р. №6

СПИСОК АВТОРІВ

Керівник НДР, Провідний науковий співробітник, канд. мед. наук	<hr/> (22.12.2020)	І.О.Винниченко (розділи 1-4)
Провідний науковий співробітник, док. мед. наук	<hr/> (22.12.2020)	Р.А. Москаленко (розділи 2-4)
Науковий співробітник, канд. мед. наук	<hr/> (22.12.2020)	О.І.Винниченко (розділи 2-4)
Науковий співробітник, док. мед. наук	<hr/> (22.12.2020)	Є.В. Кузенко (розділи 2-4)
Науковий співробітник, канд. мед. наук	<hr/> (22.12.2020)	Ю.В. Москаленко (розділи 1-4)
Науковий співробітник, канд. мед. наук	<hr/> (22.12.2020)	М.С. Линдін (розділи 2-4)
Науковий співробітник, канд. мед. наук	<hr/> (22.12.2020)	А.М. Піддубний (розділи 2-4)
Науковий співробітник, канд. мед. наук	<hr/> (22.12.2020)	В.В. Сікора (розділи 2-4)
Науковий співробітник, канд. мед. наук	<hr/> (22.12.2020)	Ю.М. Линдіна (розділи 3,4)
Молодший наук. співроб.	<hr/> (22.12.2020)	В.В. Костюченко (розділи 3)
Стажист-дослідник	<hr/> (22.12.2020)	А.О. Привалова (розділи 1,3,4)
Лаборант	<hr/> (22.12.2020)	Н.В. Казбан (розділи 2,3)
Лаборант	<hr/> (22.12.2020)	В.С. Стельмах (розділи 2,3)

Лаборант	<hr/>	В.В. Білоконь (розділи 2,4)
Лаборант	<hr/>	Б.М. Карпенко (розділи 3)
Лаборант	<hr/>	Р.Ю. Лахтаріною (розділи 2,4)
Лаборант	<hr/>	С.С. Стеценко (розділи 2,)

РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 173 с., 40 рис., 8 табл., 256 джерел літератури.

LIQUID BIOPSY, РАК МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ, РАК ЛЕГЕНЬ, РАК ПЕРЕДМІХУРОВОЇ ЗАЛОЗИ, ПЕРВИННИЙ РАК МАТКОВИХ ТРУБ, РАК МАТКИ, ІМУНОГІСТОХІМІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ, PDL-1.

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; цифрова полімеразна ланцюгова реакція «в реальному часі» для визначення вільноциркулюючої пухлинної ДНК у крові пацієнтів; статистична обробка цифрових даних.

ЗМІСТ

Перелік умовних позначень і скорочень-----	7
Вступ-----	8
1 Сучасні уявлення щодо рідинної біопсії: перспективи застосування в онкології -----	12
1.1 Проблеми діагностики онкопатології та пошук нових перспективних методик-----	12
1.2 Поняття «вільноциркулюючі пухлинні клітини; циркулююча пухлинна ДНК, РНК та екзосоми»-----	13
2 Вивчення епідеміологічних особливостей неоплазій різних локалізацій---	22
2.1 Епідеміологічні аспекти захворюваності на рак легень-----	22
2.2 Епідеміологічні аспекти захворюваності на рак молочної залози-----	26
2.3 Епідеміологічні аспекти захворюваності на злоякісні пухлини яєчка---	29
2.4 Епідеміологічні аспекти захворюваності на злоякісні пухлини яєчників---	32
2.5 Епідеміологічні аспекти захворюваності на злоякісні пухлини маткових труб-----	33
2.6 Епідеміологічні аспекти захворюваності на злоякісні пухлини передміхурової залози-----	35
3 Результати та їх обговорення-----	40
3.1 Особливості імуногістохімічної діагностики та лікування пухлин легень-----	40
3.1.1 Дослідження експресії PD-L1 у тканині раку легень та вибір тактики лікування-----	53
3.1.2 Особливості лікування запущеного дрібноклітинного раку легенів: препарати першої лінії-----	60
3.1.3 Роль мутації EGFR при лікуванні недрібноклітинного раку легень-----	69
3.2 Дослідження морфологічних та імуногістохімічних особливостей раку молочної залози-----	80

3.2.1 Дослідження РІК3СА-мутантної циркулюючої пухлинної ДНК у пацієнтів з раком молочної залози-----	92
3.3 Дослідження морфологічних та імуногістохімічних особливостей раку передміхурової залози-----	111
3.4 Гістологічні характеристики раку яєчка-----	129
3.5 Імуногістохімічні характеристики раку маткових труб-----	131
4 Висновки-----	142
Перелік джерел посилання-----	146

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ І СКОРОЧЕНЬ

РЛ-----	Рак легень
ПРМТ-----	Первинний рак маткових труб
ЦПК-----	Циркуючі пухлинні клітини
цпДНК-----	Циркуюча пухлинна ДНК
ПЛР-----	Полімеразна ланцюгова реакція
РМЗ-----	Рак молочної залози
СОКОД-----	Сумського обласного клінічного онкологічного диспансеру
РПЗ-----	Рак передміхурової залози
НДКРЛ-----	Недрібноклітинним раком легенів
ТКІ-----	Інгібіторів тирозинкінази
EGFR-----	Рецептор епідермального фактора росту
ІРНТ-----	Інвазивний рак неспецифічного типу
МЗ-----	Молочна залоза
PIK3CA-----	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha
САкМТ-----	Серозної аденокарциноми маткової труби

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 (РЛ) 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 інтралюмінальних включень (ІЛВ) – простатолітів (ПК) та амілоїдних тільцець (СА), або corpora amyloacea [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 матричної 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, Bax 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 (ПРМТ) 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 ПРМТ, 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]. Підвищення онкологічної настороженості, вдосконалення методів діагностики та запровадження імуногістохімічних методів дослідження в практику послужили відносному зростанню рівня захворюваності на ПРМТ упродовж останніх років [21].

Основними прогностичними критеріями до теперішнього часу є клінічна стадія захворювання та ступінь диференціювання неоплазії. 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. При цьому, дана задача значно ускладнюється у випадках прихованого перебігу пухлинного враження [26].

1 СУЧАСНІ УЯВЛЕННЯ ЩОДО РІДИННОЇ БІОПСІЇ: ПЕРСПЕКТИВИ ЗАСТОСУВАННЯ В ОНКОЛОГІЇ

1.1 Проблеми діагностики онкопатології та пошук нових перспективних методик

Проблема пошуку новітніх методів діагностики в онкології на сьогодні постає досить гостро [27]. Це пояснюється зростанням потреби у персоналізації лікування пацієнтів зі злоякісними захворюваннями, заснованій на молекулярних змінах в пухлині конкретного хворого. Не дивлячись на те, що класична тканинна біопсія дає змогу відповісти на значну кількість діагностичних запитань, отримані результати висвітлюють дані лише по одній невеликій ділянці первинної пухлини або метастазу, часто взятій ще до початку лікування. Від виконання повторних біопсій, як правило, пацієнти відмовляються. У клініці трапляються випадки, коли якість морфологічного матеріалу або його неправильне зберігання не дозволяють виконати генетичне дослідження, та й виконання самої біопсії не завжди є можливим, оскільки доступ до пухлини може бути значно утрудненим або навіть небезпечним для пацієнта. Все це визначило розвиток альтернативних шляхів вивчення пухлинного матеріалу в хворих [28].

Одним з найперспективніших методів, які використовуються, є рідинна біопсія. Вона отримала величезну увагу в онкології завдяки своєму очевидному клінічному значенню для персоналізованої медицини [29]. Цей діагностичний метод являє собою інноваційне дослідження крові з метою виявити та проаналізувати біомаркери, що циркулюють в крові. До таких відносять: циркулюючі пухлинні клітини (ЦПК), позаклітинна циркулююча пухлинна ДНК (цпДНК) в крові, циркулюючі РНК та екзосоми, які вивільняються з первинних пухлин та їх метастатичних вогнищ. Основною перевагою рідинної біопсії над класичною є її неінвазивність, що дозволяє вільно використовувати її за будь-якої нагальної потреби. Ще однією вагомою перевагою рідинної біопсії є її гетерогенність, яка полягає в

можливості виявлення всіх можливих типів пухлинних клітин, навіть при мінімальній їх концентрації в крові. Ця особливість дозволяє підійти до лікування персоналізовано, а також підібрати найбільш оптимальну схему лікування з метою попередження рецидиву пухлинного процесу. Особливий інтерес рідинна біопсія представляє собою у хворих, яким було проведено оперативне лікування, оскільки в них існує нагальна потреба оцінити результат проведеного лікування у різні періоди, відповідь організму на проведене лікування, а також з метою моніторингу ефективності проведених додаткових методів лікування, зокрема, неоад'ювантної терапії. У прооперованих хворих рідинна біопсія може бути предиктором рецидиву, а також дати відповіді щодо результатів лікування у віддалені терміни [30]. Отже, ключовими областями клінічного застосування рідинної біопсії є виявлення раку, визначення прогнозу у пацієнтів з курабельним захворюванням, моніторинг системної терапії і стратифікація хворих, базована на виявленні терапевтичних мішеней або механізмів резистентності [29].

1.2 Поняття «вільноциркулюючі пухлинні клітини; циркулююча пухлинна ДНК, РНК та екзосоми»

Циркулюючі пухлинні клітини

Вперше опис ЦПК в крові хворих на рак пацієнтів був задокументований 1869 року [31]. Добре відомо, що гематогенна дисемінація пухлинних клітин (як поодиноких, так і у вигляді кластерів) є одним з провідних шляхів в утворенні та формуванні метастазів, оскільки пухлинні клітини вже на початку захворювання можуть вивільнятися з первинних вогнищ. Проте їх кількість є дуже малою, в порівнянні з мільйонами лейкоцитів та трильйонами еритроцитів, і варіює у межах 1-10 клітин в 1 мл периферичної крові. Період їх напіврозпаду також незначний, і складає 1-2,4 години. Було вивчено, що від кількості ЦПК залежить кількість метастазів,

проте достеменно відомо, що ЦПК можуть також вивільнятися у кровотік з вторинних метастатичних вогнищ навіть через роки після резекції первинної пухлини [27]. Чи є викид ЦПК у кровотік випадковим процесом або він зумовлений специфічною біологічною програмою, все ще залишається предметом дискусій [29, 32].

З метою визначення кількості ЦПК використовуються різні методики. В основі одних лежать біологічні властивості клітин, тоді як в інших – фізичні властивості, які дають можливість відрізнити ЦПК від інших клітин периферичної крові: клітинна густина, розмір, електричний заряд на поверхні клітинних мембран, здатність клітин до деформації. В таблиці 1.1 показані основні методи, які використовують на даний час.

Таблиця 1.1 – Огляд наразі існуючих методів для визначення ЦПК

Збагачуючий прилад/ метод	Техніка	Властивості та переваги	Обмеження
Методи, засновані на біологічних властивостях			
CellSearch	Сортування клітин за допомогою магнітної активації	Затверджено Food and Drug Administration (FDA)	Низька варіабельність для дослідних цілей
AdnaTest, AdnaGen	Заснований на імуномагнетизмі	Виявлення ЦПК та подальший аналіз їх транскрипту	Лише «+» -адгезивні молекули епітеліальних клітин можуть бути визначені
CNC-chip	Мікрорідинні	Загальне збагачення ЦПК	Повільний; лише невеликий об'єм крові може бути дослідженим
HB-chip			
CTC-iChip			
Graphene Chip			

Продовження таблиці 1.1

CellCollector	Дослідження in vivo, засноване на захопленні адгезивних молекул	In vivo виявлення, як наслідок у великому об'ємі крові	Зображення на CellCollector ЦПК складне
EPISPOT	Аналіз для виявлення секретованих білків	Життєздатні ЦПК можуть бути виявлені	Непряме дослідження, оскільки оцінюється лише за секретованим білком
Методи, засновані на фізичних властивостях (розмір, густина/щільність)			
Ficoll, Osoquick	Конфігурація градієнту щільності	Заснований на щільності	Неспецифічні клітини втрачаються
RosetteSep	Негативне збагачення	Простий; може захопити життєздатні ЦПК	Неспецифічні клітини втрачаються
ScreenCell	Виключення засноване на фільтрації за розміром	Простий, не потребує додаткового обладнання	Ухилення за розміром, оскільки малі ЦПК можуть бути втрачені
ISET	Виключення засноване на фільтрації за розміром	Простий та швидкий	Ухилення за розміром, оскільки малі ЦПК можуть бути втрачені. Потребує додаткового устаткування.

Фізичні властивості досліджують переважно методами ізоляції, в основі яких лежить принцип фільтрації, який є найбільш обіцяючим в плані прогнозу та скринінгу.

Кількість ЦПК є прогностичним фактором, який дозволяє визначити виживаність без прогресування та загальну виживаність, особливо у хворих на недрібноклітинний РЛ, рак молочної залози (РМЗ), колоректальний рак та рак передміхурової залози.

Використання ЦПК є дещо лімітованим через низьку кількість клітин та дороговартість методик. Проте їх клінічну значимість вперше було доведено 2004 року, а чисельні проведені мета-аналізи підтверджують прогностичну значимість ЦПК [27].

Циркуюча пухлинна ДНК (цпДНК)

В 60-ті роки ХХ сторіччя групою вчених на чолі з Stroun була продемонстрована присутність пухлинно-асоційованих аберацій та наявність циркулюючих фрагментів пухлинних ДНК [27]. ЦпДНК являють собою фрагменти ДНК загиблих пухлинних клітин, які потрапили в системний кровотік. Більшість фрагментів цпДНК складаються з 180-200 пар основ, що свідчить про те, що вони частіше виникають в процесі апоптозу, проте деяка частина цпДНК виділяється з некротизованих клітин [30, 33]. На сьогодні вже відомо про мутації в пухлинних супресорах та онкогенах, втрату гетерозиготності, мікросателітну нестабільність, ДНК метилювання, проте існує мала кількість даних, які б пояснювали походження, механізми та кінетику появи або кліренсу таких ДНК. За рахунок низької кількості таких фрагментів в циркулюючій крові існують певні труднощі в аналізі, однак новітні розробки в молекулярних технологіях допомогли досягти необхідної чутливості та специфічності у виявленні малих кількостей цпДНК. З цією метою радять використовувати сироватку, замість плазми [27,29,30].

За принципом, технології для визначення цпДНК можна розділити на таргетні методи, покликані виявити мутації в наборі заздалегідь визначених генів (наприклад, KRAS в контексті блокування EGFR антитілами) або

нетаргетні методи (наприклад, матриксна порівняльна геномна гібридизація (array comparative genomic hybridization (array-CGH), повногеномне секвенування або секвенування екзому), які спрямовані на аналіз генома і виявлення нових геномних аберацій, наприклад, таких, що забезпечують стійкість до конкретної таргетної терапії [29,34]. Загалом, таргетні методи мають вищу аналітичну чутливість, ніж нетаргетні методи, незважаючи на значні зусилля вдосконалити поріг чутливості [29,35]. Нещодавно спостерігалась поява високочутливих технологій, здатних виявити найменшу кількість цпДНК в "морі" нормальної позаклітинної ДНК, які необхідні для раннього виявлення раку або мінімального залишкового захворювання [28,29,36].

З моменту першого цілеспрямованого виділення мутацій в 1990 році [27,32] було розроблено високочутливі та специфічні методи для виявлення цпДНК: BEAMing, plasma Safe-Sequencing (Safe-SeqS), tagged-amplicon deep sequencing (TAm-Seq), цифрова полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), які дозволяють виявити одонуклеотидні мутації у цпДНК, повногеномне секвенування (whole-genome sequencing) – встановлює зміни числа копій генів [28,29,34].

Особливо високими показниками чутливості вирізняється PARE (personalized analysis of rearranged ends), яка дозволяє виявити цпДНК вже при 0,001% його наявності в циркулюючому руслі. Newman запропонував метод CAPP-Seq (CAncer Personalized Profiling by deep Sequencing), як надчутливий до визначення цпДНК, а Forshew зі співавторами розробили TAm-Seq (Tagged-amplicon deep sequencing) метод. Метод TAm-Seq дозволяє визначити ракові мутації в алелях з частотою нижчою за 2%, маючи при цьому чутливість та специфічність вищу за 97%. Вищеперелічені методи дозволяють виявити не тільки точкові мутації в цпДНК, але й комплекс аберацій зі змінами кількості (ампліфікація, делеція, анеуплоїдія) або послідовності (транслокації, інверсії) великих фрагментів ДНК. Перспективним є визначення рівня метилювання пухлинного геному, проте

значним недоліком його використання є низька специфічність, оскільки метилювання не є пухлинно-специфічним процесом і може спостерігатись в нормальних тканинах. Однак навіть враховуючи ці недоліки, визначення рівня метилювання цпДНК може виявитись корисним маркером для визначення динамічних змін, що відбуваються в пухлині, та бути одним з основних скринінгових методик [33].

Виявлення раку шляхом моніторингу цпДНК отримало велику увагу [29,37,38]. Найбільший технологічний виклик – це виявлення дуже низької кількості цпДНК у зразках крові з різною кількістю позаклітинної ДНК та вибір вірної панелі геномних аберацій, специфічних для раку. Нещодавно команда Джона Хопкінса використала технології на основі цифрової полімеразної ланцюгової реакції для оцінки можливості виявлення пухлин за допомогою визначення цпДНК у 640 пацієнтів з різними формами раку. ЦпДНК була розпізнана лише у 48-73% пацієнтів з локалізованими формами раку: колоректальний рак, кардіоезофагальний рак, рак підшлункової залози та аденокарцинома молочної залози. Хоча ці показники вагомі, проте вони не є достатніми для раннього виявлення раку. ЦпДНК часто була присутня у пацієнтів без виявлених ЦПК [29,39]. Інші дослідники показали, що у 100% пацієнтів з II – IV та у 50% з I стадією недрібноклітинного РЛ визначалась цпДНК [27,33,35]. Однак було також показано, що з віком можливе виникнення так званих рак-асоційованих мутацій, які ніколи не призведуть до виникнення раку протягом життя. Не дивлячись на великі сподівання, покладені на вищеперелічені методи, їм і досі не вистачає достатньої чутливості і тому вони потребують певної кількості цпДНК, які ще можуть бути відсутніми у хворих на початкових стадіях [27]. Таким чином, виявлення пов'язаних з раком мутацій на позаклітинній ДНК може не вказувати на те, що обстежувана особа вже має рак або у неї розвинеться рак протягом життя, але це може бути приводом значного занепокоєння та проведення розширених діагностичних процедур з такими побічними явищами, як опромінення [29].

Кількість цпДНК залежить від пухлинної маси в організмі людини, одночасно зростаючи при збільшенні об'єму пухлини, оскільки збільшується кількість клітин, які підлягають апоптозу і некрозу. Додатковими факторами, що впливають на кількість цпДНК є гістологічний тип пухлинних клітин, розмір пухлинних вогнищ та їх васкуляризація. Збільшенню кількості цпДНК сприяє спосіб утилізації загиблих клітин: при фізіологічній загибелі нормальних клітин організму продукти їх розпаду поглинаються та перетравлюються фагоцитами, тоді як процес фагоциткування пухлинних клітин менш ефективний, що сприяє накопиченню клітинного детриту, який здатен виділяти пухлинну ДНК в циркулюючий кровотік, в результаті чого частка цпДНК може складати від 0,01 до 90% від загальної кількості циркулюючих ДНК. Невелике дослідження Murtaza et al. показало принципову можливість використання цпДНК для повного секвенування пухлинного екзома та спостереження за його еволюцією протягом лікування РМЗ, яєчників, легень [30]. Ще одною перевагою визначення цпДНК є відносно короткий час напіврозпаду в циркулюючій крові (близько 2 годин), що дозволяє оцінити динаміку пухлинної маси через кілька годин після її реальних змін.

Основною проблемою у використанні цпДНК є відсутність чітких стандартів і невелика кількість проведених клінічних досліджень. Тож, визначення рівня цпДНК може бути також використане як прогностичний маркер у хворих після хірургічного лікування з метою визначення необхідності додаткової ад'ювантної терапії, визначення групи ризику виникнення нових вогнищ, рецидиву (оскільки методики враховують пухлинні клітини та цпДНК, які рознесені по організму, але не утворюють вогнищ), призначення таргетної терапії або з метою швидкої модифікації терапії хворим, за умови неефективності попередньої [27,38].

Циркулююча пухлинна РНК та екзосоми

Додатково до основних методів рідинної біопсії – визначення цпДНК та ЦПК, маленьким, але дуже перспективним розділом є визначення

циркулюючої пухлинної РНК. Популярність циркулюючих РНК значно зросла в останні 10 років. Так, протягом 2005 року було опубліковано лише 85 робіт, тоді як протягом 2015 року їх кількість склала 3680. Перспективність їх широкого використання полягає у можливості їх визначення у більшості біологічних рідин: плазмі, сироватці крові, цереброспинальній рідині, слині та сечі, що є значною перевагою. З метою визначення РНК використовуються RT-qPCR (Reverse Transcription quantitative PCR) методи, які засновані на гібридизації, та методи, в основі яких лежить секвенування. Важливим є те, що залежно від виду біологічної рідини та способу екстракції РНК варіюють також і діагностичні рівні. Перспективною є можливість використовувати циркулюючі РНК з прогностичною метою для РМЗ, колоректального раку і особливо плоскоклітинного РЛ. Основною проблемою для їх широкого використання є відсутність стандартизації, а також висока залежність отриманих результатів від умов, які передували аналізу, зокрема, температура та використовувані консерванти, дієта пацієнта, стиль його життя та вживання ліків. Однак за рахунок можливості виділення РНК з різних біологічних рідин організму у клініцистів з'являється можливість проведення рутинних досліджень не тільки з метою виявлення хвороби та її прогресії, але й з метою виявлення невідомого походження пухлин та метастазів [27].

Отже, широке впровадження малоінвазивного та високочутливого методу «liquid biopsy» дозволяє подолати діагностичні труднощі за рахунок отримання інформації щодо складу та набору мутації у неопластичній тканині шляхом дослідження вцпНК у різних біологічних рідинах[39]. Саме тому, порівняння колекції сироваток хворих на злоякісні пухлини з гістологічними та іміногістохімічними результатами аналізу цих пухлин дозволить стандартизувати показники дослідження “liquid biopsy” для впровадження у лікувально-діагностичний процес. Рідинна біопсія, сфокусована на аналізі ЦПК та цпДНК у крові хворих на рак, отримала величезну увагу завдяки своєму очевидному клінічному значенню для

персоналізованої медицини. Визначення ЦПК та цпДНК проклало нові діагностичні шляхи і, на сьогоднішній день, є наріжним каменем рідинної біопсії. Наскільки вони зможуть замінити тканинну біопсію в майбутньому залишається предметом дискусій. Для первинної діагностики пухлин, для яких утруднене проведення тканинної біопсії, а також для рестадіювання та молекулярного аналізу метастатичних вогнищ, рідинна біопсія може стати альтернативою. Крім того, вона може допомогти направити сучасні методи діагностики раку на осіб з підвищеним ризиком, що в перспективі дозволило б зменшити побічні ефекти (наприклад, опромінення при проведенні мамографії) та витрати на медичне обслуговування. Однак, незважаючи на декілька перспективних перших результатів та величезний інтерес діагностичних компаній та публічної преси ("виявлення раку з краплі крові"), раннє виявлення раку стикається з такими серйозними проблемами як чутливість та специфічність. Напроти, моніторинг ЦПК та цпДНК під час системної терапії у онкологічних хворих може стати тим напрямком застосування, який буде простішим та ближчим щодо впровадження до клінічної практики. Аналізи ЦПК та цпДНК для мутацій, що дають відповідь на лікування або є стійкими до таргетної терапії, вже продемонстровані в ряді досліджень. Більше тестів на мутації в генах, які кодують терапевтичні мішені та відповідні гени резистентності, очікуються найближчим часом [39].

Результати за даним напрямком роботи опубліковані виконавцями науково-дослідної роботи у наступних працях:

1. Винниченко І.О., Привалова А.О., Смородська О.М., Винниченко О.І., Москаленко Ю.В. Рідинна біопсія: перспективи застосування в онкології (огляд літератури). Art of Medicine. 2018;1(5):85-91.

2 ВИВЧЕННЯ ЕПІДЕМІОЛОГІЧНИХ ОСОБЛИВОСТЕЙ НЕОПЛАЗІЙ НЕОПЛАЗІЙ РІЗНИХ ЛОКАЛІЗАЦІЙ

2.1 Епідеміологічні аспекти захворюваності на рак легень

В усіх економічно розвинутих країнах проблема РЛ є однією з найважливіших і водночас складних у сучасній онкології. Швидке зростання захворюваності на РЛ, який уражає працездатний контингент населення і має характер епідемічного лиха, стало не тільки медичною, а й соціальною проблемою. Це найбільш поширене злоякісне захворювання після епітеліальних пухлин шкіри, а також провідна причина смерті від раку в усьому світі. Найвища захворюваність на РЛ зафіксована в найбільш промислово розвинутих країнах – США, Англії, Німеччині, Японії [40-42].

Поширеною є думка, що основною причиною смерті чоловіків є РЛ, а жінок – РМЗ. Проте, згідно даних всесвітньої статистики раку, починаючи з 1990 року РЛ у жінок зрівняв свої позиції зі злоякісними пухлинами молочної залози [41]. Згідно даних на 2015 рік серед європейок спостерігається тенденція до підвищення захворюваності на 9 % до рівня 14,24/100 000. У американок показники захворюваності постійно збільшувалися і досягли 43,3 / 100 000, а смертність – 33,6/100 000 [43-45]. У Швеції, Данії, Ісландії рівень захворюваності серед жінок перевершив аналогічні показники у чоловіків [46]. Серед жінок України захворюваність на РЛ відповідає європейським показникам 13,2/100 000, смертність займає 4–5 місце (10,4/100 000) в структурі загальної онкологічної смертності. У віковому інтервалі 60–79 років захворюваність на РЛ зростає від 37 до 70 випадків, відповідно збільшується і смертність: з 25 до 50 на 100 тис. жіночого населення.

Первинним статистичним матеріалом виступили дані обласного канцер-реєстру та журнали реєстрації результатів біопсій патологоанатомічного відділення Сумського обласного клінічного онкологічного диспансеру. Для виявлення тенденцій у розвитку РЛ серед

жінок Сумської області були використані аналіз середніх величин, динамічний аналіз, для оцінки розкиду – стандартне відхилення. Після вивчення епідеміологічних даних захворюваності населення на РЛ у Сумській області за даними канцер-реєстру Сумського обласного клінічного онкологічного диспансеру (СОКОД) впродовж періоду 2012–2016 років було виявлено, що середня поширеність складає 43,3 на 100 000 (рис. 2.1). За даними Національного канцер-реєстру, у період 2012–2016 років у Сумській області було зареєстровано 2449 випадки РЛ, із них 1924 (78,6 %) у чоловіків і 523 (21,4 %) у жінок. Співвідношення чоловіків та жінок 3,7 : 1 відповідно. У середньому за рік реєструється $104,6 \pm 6,7$ жінки, хворих на РЛ. Середнє значення поширеності РЛ серед жінок за 2012–2016 рр. складає $9,97 \pm 0,98\%$, коефіцієнт варіації – 9,73 %. Чіткої тенденції у динаміці показника (зниження чи підвищення) не прослідковується, варіація показників за 5 років є незначною (менше 10 %) [47-50].

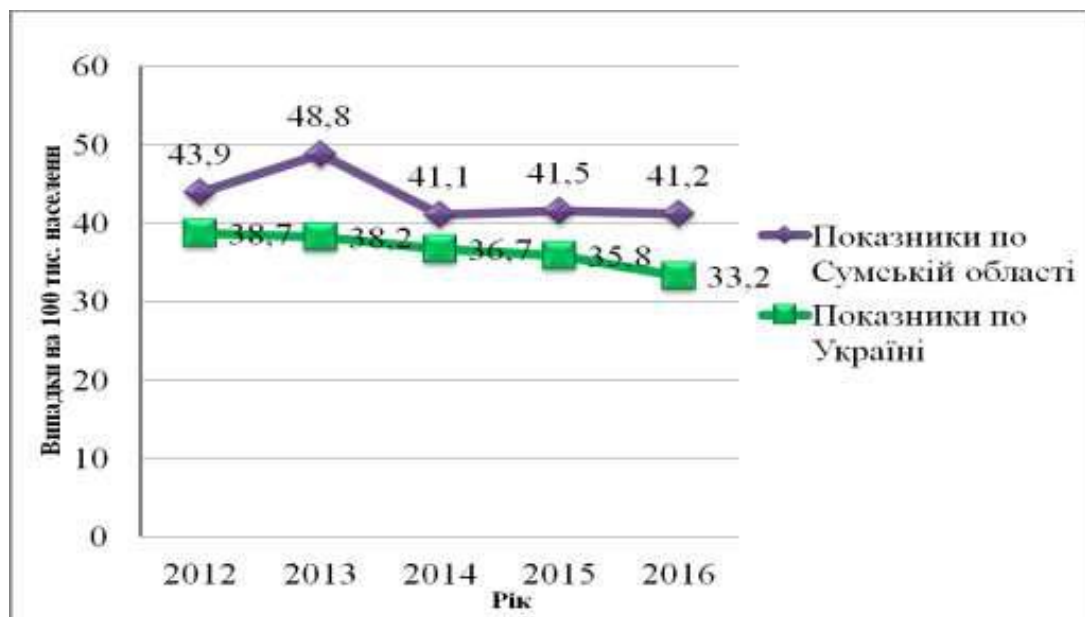


Рисунок 2.1 – Загальні показники поширеності на рак легень у Сумській області та в Україні впродовж 2012–2016 років. Вісь абсцис – випадки на 100 тис, вісь ординат – роки.

Середній темп поширеності РЛ серед жінок за 2012–2016 р. становить 97,1 %, тобто в середньому за 5 років поширеність серед жінок Сумського

регіону РЛ знизилася на 2,9 %. Найвищий середній темп росту виявлений у Краснопільському (125,7 ‰) та Середино-Будському (121, 8‰) районах. У певних роках відмічаються суттєві зростання показника поширеності по районах області. Наприклад, у 2015 р. в Липово-Долинському районі кількість хворих жінок зросла в 26,8 раз. У 2016 р. в Середино-Будському районі показник зріс у 5,5 раз. На нашу думку, це пов'язано з інтенсифікацією профілактичних оглядів у тій чи іншій місцевості у певні роки. Впродовж 2012–2016 рр. значення поширеності РЛ серед жінок сумського регіону менші від загальноукраїнських (9,97 проти 13,2 на 100 000 відповідно) (рис. 2.2). Динаміка як загальноукраїнських, так і показників регіону не є чітко визначеною. Так у 2014 р. спостерігаємо зниження величини показника в Україні та Сумській області (на 11,3 % та 22,5 % відповідно) [51,52].

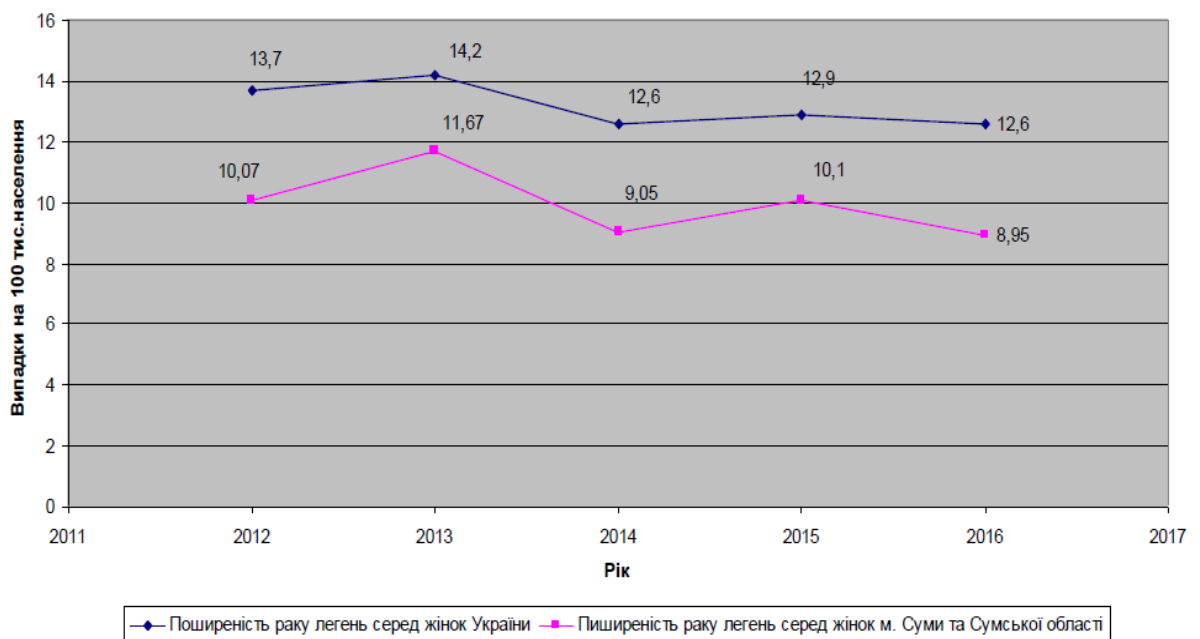


Рисунок 2.2 – Показники поширеності на рак легенів серед жінок Сумської області та України впродовж 2012–2016 років. Вісь абсцис – випадки на 100 тис, вісь ординат – роки.

Співвідношення смертність/захворюваність від РЛ у чоловічого населення Сумської області у 2014 р. становила 86,8 %, у жіночого – 65,6 % за даними Національного канцер-реєстру раку 2014–2015 рр. Тобто

ймовірність померти у жінок у випадку хвороби у 1,3 рази менше, ніж у чоловіків [51,52].

При проведенні вікового аналізу пацієток, хворих на РЛ виявлено, що найчастіше РЛ зустрічається у жінок старше 70 років. На їх частку припадає 54,4 % усіх випадків. Також високі показники демонструє вікова група 55–69 років. Треба відмітити, що впродовж п'ятирічного періоду виявлена 1 хвора молодше 25 років, а частка пацієток віком 25 – 39 років є незначною (рис. 2.3).

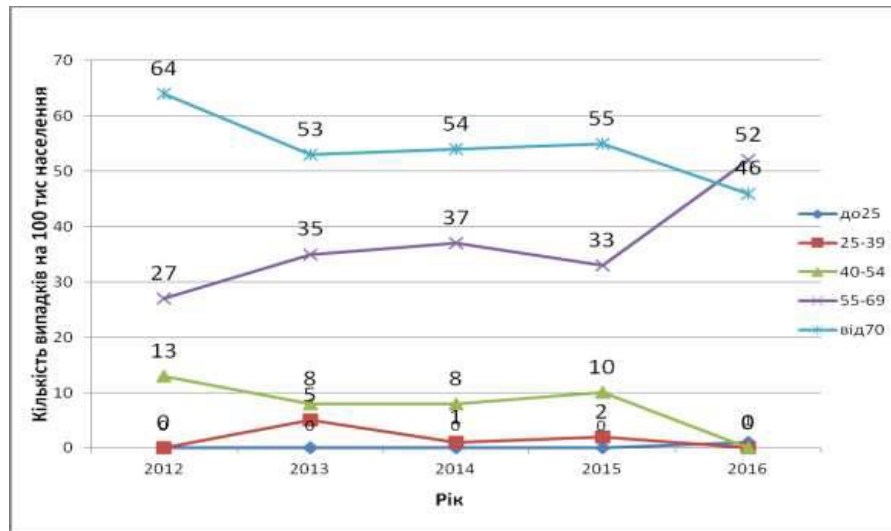


Рисунок 2.3 – Віковий розподіл жінок, хворих на рак легень за період 2012–2016 років у Сумській області.

Результати за даним напрямком роботи опубліковані виконавцями науково-дослідної роботи у наступних працях:

Винниченко І.О., Москаленко Ю.В., Тарасенко С.В., Винниченко О.І., Пустовгар Л.Г., Смородська О.М., Сердюк М.Ю. Аналіз поширеності раку легень серед жінок сумської області. *J. Clin. Exp. Med. Res.*, 2017;5(3):881–90.

Винниченко І.О., Москаленко Ю.В., Сердюк М.Ю., Винниченко О.І. Особливості диференціальної діагностики доброякісних пухлин легень та її значення для вибору хірургічної тактики. *Клінічна хірургія*. 2018;85(4):67–70.

2.2 Епідеміологічні аспекти захворюваності на рак молочної залози

Аналіз захворюваності на РМЗ як в Сумській області та вивчено тенденцію даної патології як в Україні та світі в цілому. Виявлено, що ці показники продовжують щорічно зростати, що пов'язано з поширенням цієї зловісної недуги та, в якійсь мірі, з вдосконаленням діагностики захворювань [53,54]. Так в період з 2004 по 2014 роки число хворих, прооперованих в Сумському обласному клінічному онкологічному диспансері з приводу РМЗ, збільшилося на 37% (2004 рік – 222, 2014 – 305). В структурі загальної патології у прооперованих на рак займає також лідируюче місце. Так, у 2004 році з 570 прооперованих на РМЗ склав 39% (у 22% діагностовано фіброаденому, 38,5% складала різні форми фіброзно-кістозної хвороби та 1 випадку діагностовано фібросаркому), а у 2014 році епітеліальні неоплазії МЗ були виявлені у 46% випадків (всього прооперовано 662 жінки), у 25% та у 29% фіброаденоми та фіброзно-кістозні хвороби відповідно.

Показники ж останніх років демонструють, що РМЗ продовжує займати одну з лідируючих позицій у структурі онкологічної патології – за останні 10 років цей показник у середньому дорівнює $64,51 \pm 2,85$ на 100 тис. населення.

Щодо розподілу по районах, то згідно даних відділу статистики при Сумському обласному клінічному онкологічному диспансері відносно великі показники захворюваності на РМЗ спостерігаються в Шосткінському, Ямпільському та С-Будському районах, при більш низьких показниках в Краснопільському, В-Писарівському та Тростянецькому районах (Рис. 2.4). Так, розраховуючи на 100 тис. населення, кількість жінок, хворих на РМЗ, в північних районах майже в два рази переважає над онкохворими з відносно «екологічно-чистих» районів Сумської області [55].

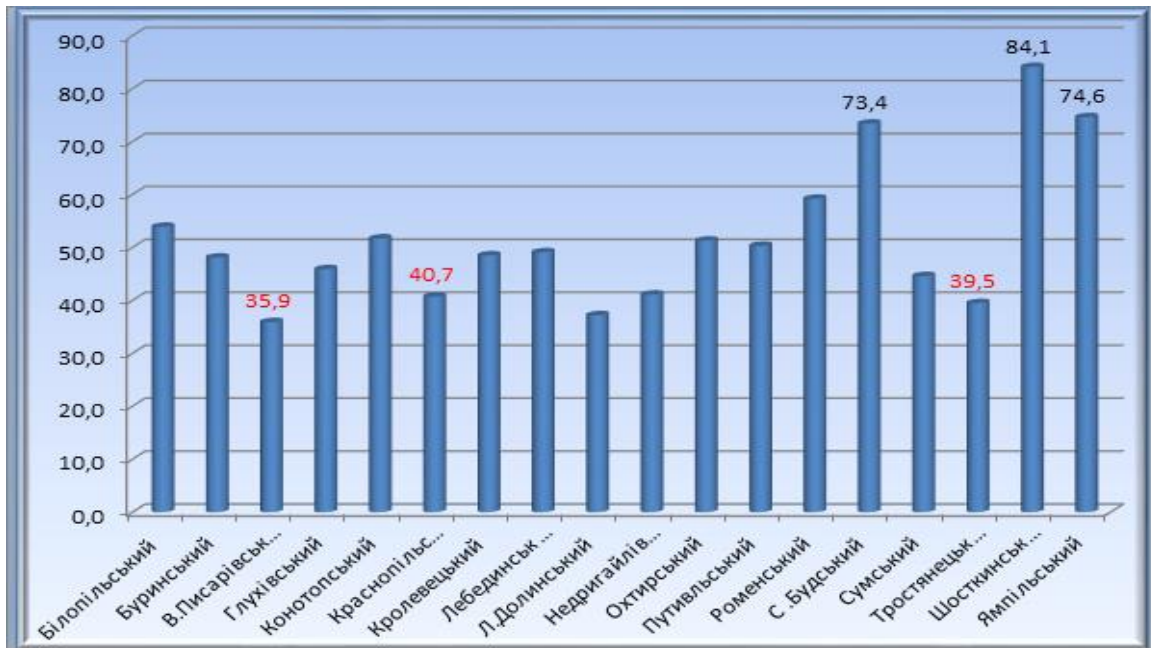


Рисунок 2.4 – Захворюваність на РМЗ в Сумській області
(на 100 тис. населення).

Аналіз вікового злоякісного враження молочних залоз показав, що дана патологія зустрічається як у дітей, так і людей літнього віку. При цьому, найчастіше на дану патологію хворіють жінки у постменопаузі.

Серед усіх морфологічних форм РМЗ більша половина випадків має гістологічний діагноз «Інвазивний рак неспецифічного типу» різного ступеню диференціювання з та без метастатичного ураження лімфатичних вузлів та інших органів [55].

Захворюваність на злоякісні пухлини в Україні знаходиться на високому рівні (рис. 2.5), у середньому складаючи $332,52 \pm 19,46$ на 100 тис. населення. Серед них 71,5% припадає на міське населення, 28,5% випадків виявлено у жителів сільської місцевості. РМЗ займає одну з лідируючих позицій у структурі онкологічної патології – за останні 10 років цей показник у середньому дорівнює $64,51 \pm 2,85$ на 100 тис. населення. Більшість випадків (99,2%) виявлено у пацієнтів жіночої статі, і лише 0,8% випадків спостерігалось у чоловіків [55].



Рисунок 2.5 – Показники захворюваності на злоякісні пухлини (в тому числі РМЗ) в Україні у період з 2010 по 2019 рр на 100 тис. населення

Незважаючи на незначне покращення показників, починаючи з 2014 року, останнім часом спостерігається тенденція до наближення показників захворюваності на злоякісні пухлини, у тому числі і РМЗ, до рівня попередніх років.

Аналізуючи вищезазначене, можна стверджувати, що РМЗ в Сумській області займає високі позиції серед онкологічної захворюваності з подальшою тенденцією до росту [55].

Результати за даним напрямком роботи опубліковані виконавцями науково-дослідної роботи у наступних працях:

Линдін М.С., Романюк А.М. Інвазивний рак неспецифічного типу молочної залози: гістологічні та імуногістохімічні особливості / Challenges of medical science and education: an experience of EU countries and practical introduction in Ukraine : Collective monograph. – Riga: Izdevnieciba “Baltija Publishing”, 2020. – С. 264–281.

2.3 Епідеміологічні аспекти захворюваності на злоякісні пухлини яєчка

Згідно результатів проведеного аналізу виявлено, що найбільша захворюваність на рак яєчка в Україні серед дорослого населення була в 2013 році (3,11 на 100 тис. населення), найнижча – в 2017 році (2,4 на 100 тис. населення). У той же час, частота розповсюдженості даної патології в Сумській області відрізнялась від загальноукраїнських показників: найвищий рівень у 2017 році (4,33 на 100 тис. населення), а найнижчий – у 2019 році (1,96 на 100 тис. населення). Виходячи з цього, на противагу тенденції до зниження показників захворюваності на рак яєчка в Україні, відмічається поступове збільшення захворюваності в Сумській області з перехрестом (зростання та зниження захворюваності) у 2013-2014 роках (рис. 2.6) [56].



Рисунок 2.6 – Показники захворюваності на рак яєчка в Україні та Сумській області серед дорослого населення в період 2011-2019 років. (на 100 тис. населення)

Аналіз вперше виявлених захворювань на дану патологію серед дорослого населення показав, що: максимальна кількість випадків раку яєчка в Україні склала – 525 у 2013 році, а мінімальна – у 2017 році (377 випадки).

На противагу цьому, у Сумській області найбільше число хворих на рак яєчка виявлено в 2017 році – 18 випадків, а найменше – 2019 році (8 чоловіків) (рис. 2.7) [56].

За результатами дослідження захворюваності населення на рак яєчок спостерігається певний зв'язок з віком. Установлено, що в цілому по Україні на дану патологію хворіли чоловіки переважно у віці 35-39 років (4,7 на 100 тис. населення), що співпадало з показниками у Сумській області (7,9 на 100 тис. населення). Проте, варто відмітити, що віковий діапазон захворюваності в обраній області був дещо ширшим та переважно вражав населення віком 30-39 років. Однак, як виняток, у 2017 році працездатне населення Сумської області найбільше хворіло на рак яєчка в 20-24 роки (9,9 на 100 тис. населення). У 2013 році показники захворюваності сягнули свого піку (8,3 на 100 тис. населення) у пацієнтів у віці 25-29 роки [56].

ЧИСЛО ВПЕРШЕ ВІЯВЛЕНОГО РАКУ ЯЄЧКА СЕРЕД ДОРΟΣЛОГО НАСЕЛЕННЯ



Рисунок 2.7 – Показники абсолютних чисел пацієнтів вперше виявленого раку яєчка в Україні та Сумській області серед дорослого населення в період 2011-2019 років

Важливо відмітити, що захворюваність на рак яєчка серед дитячого (0-18 років) населення по всій країні досить низька. Найвищий показник захворюваності на рак яєчок був зафіксований у 2012 та 2014 роках – 18 і 19 випадків (0,4-0,49 на 100 тис. населення) відповідно, а найнижчий – у 2011

році 4 випадки – (0,1 на 100 тис. населення). Такі показники можуть свідчити про зростання кількості нових хворих дитячого віку за останні роки та тенденцію до «омолодження» даної онкологічної патології. При цьому, в Сумській області, був зареєстрований лише один випадок онкопатології у дитини в 2012 році (1,08 на 100 тис. населення) та два випадки в 2019 році (2,3 на 100 тис. населення) (рис. 2.8) [56].

Таким чином, аналіз захворюваності на рак яєчка в Україні та Сумській області показав деякі відмінності у тенденціях до зростання цього показника на Сумщині. На нашу думку, така ситуація може пояснюватися погіршенням екологічної ситуації (забруднення довкілля солями важких металів), та особливостями діагностики у різні часи в Сумській області. Активізацію пухлинного росту і механізм канцерогенезу у інших органах репродуктивної системи в умовах забрудненого довкілля висвітлено у попередніх наших роботах. Подібний механізм може мати місце у чоловіків при раку яєчка [56].



Рисунок 2.8 – Кількість випадків та частота захворюваності на рак яєчка в Україні серед дитячого населення в період 2011-2019 років

Результати за даним напрямком роботи опубліковані виконавцями науково-дослідної роботи у наступних працях:

Brusovtsov D, Lyndin M, Sikora V, Hyriavenko N, Romaniuk A. Research on the incidence of malignant testicular tumors in Ukraine and Sumy region. Eastern Ukrainian Medical Journal. 2020;8(2):145-152.

2.4 Епідеміологічні аспекти захворюваності на злоякісні пухлини яєчників

Пухлини яєчників є однією з актуальних проблем сьогодення та мають суттєву питому вагу серед захворювань органів репродуктивної системи у жінок. У загальній структурі захворюваності на злоякісні новоутворення рак яєчників посідає шосте місце та п'яте місце серед показників смертності, що зумовлено не лише значною частотою пухлинного процесу даної локалізації, а й високим рівнем смертності від раку яєчників у всьому світі [57-59]. Так, в Україні станом на 2018 рік зареєстровано 3539 нових випадків злоякісних новоутворень яєчників, при цьому показник летальності склав – 1808. Відомо, що однорічна виживаність хворих на злоякісні новоутворення яєчників становить 65%, в той час як трирічна та п'ятирічна складає 40% та 32% відповідно [57-60]. При цьому, з кожним роком частота пухлинного враження яєчників демонструє тенденцію до зростання ризиків даного захворювання, що становить медико-соціальну проблему для населення. Загалом, це знаходить своє відображення у зниженні показників працездатності серед жінок та якості життя [57].

У цілому рак яєчників найбільш часто зустрічається в індустріально розвинених країнах, що може свідчити про безпосередній вплив урбанізації та значного антропогенно-техногенного забруднення довкілля на ризик мутації генетичного матеріалу [60-64]. Так, найвищий рівень захворюваності відзначається в Північній Європі (13 на 100 тис. населення), а найнижчий в Північній Африці – 2,5 на 100 тис. населення. В той же час, в Україні показник захворюваності становить 9,3 на 100 тис. населення, що свідчить про високі показники первинного пухлинного враження органу, характерні для індустріальних країн [57,64].

Виділяють основні фактори ризику, які сприяють розвитку злоякісних новоутворень яєчників, таких як раннє менархе та пізній постменопаузальний період (за рахунок збільшення кількості овуляторних

циклів), в той час як прийом оральних контрацептивів, вагітність та лактація сприяють зниженню виникненню даної патології [61-65]. Важливо відмітити, що частота виникнення злоякісних новоутворень яєчників безпосередньо залежить від віку жінок та здебільшого зустрічається у віці від 45 до 65 років. Рак яєчників вважається захворюванням клімактеричного періоду, тобто розвивається на тлі регресу репродуктивних функцій організму [64].

Результати за даним напрямком роботи опубліковані виконавцями науково-дослідної роботи у наступних працях:

Чижма РА, Біденко МВ, Николенко АП, Піддубний АМ, Москаленко РА. Патологічна біомінералізація при пухлинах яєчників. Вістник проблем біології і медицини. 2020; 4(158):43-48. DOI: 10.29254/2077-4214-2020-4-158-43-48

2.5 Епідеміологічні аспекти захворюваності на злоякісні пухлини маткових труб

Епідеміологічні показники поширення злоякісних пухлин маткових труб (МТ) вказали, що частіше дана патологія є одностороннім процесом і вражає ампулярний відділ труби. Двобічне залучення в пухлинний процес МТ описане лише у 10–27 % випадків [66].

Загальна 5-річна виживаність для раку маткових труб (РМТ) на всіх етапах становить від 35 до 56 % [67], що напряму залежить від клінічної стадії захворювання, значно перевищуючи показники інших гінекологічних пухлин [68]. Це відбувається внаслідок ранніх лімфогенних метастазів первинного раку маткових труб (ПРМТ) у лімфатичні вузли, карциноматозу очеревини та віддаленого поширення у внутрішні органи, що пов'язано з рясною лімфатичною мережею МТ. Медіана виживаності в пацієнтів із та без лімфодисекції становить 43 та 21 місяців відповідно [66,69].

ПРМТ виникає найчастіше між четвертим і шостим десятиліттям. Проте є повідомлення про ПРМТ у молодих дівчат у віці 17–19 років [70].

Стадія захворювання на момент установлення діагнозу є важливим фактором, що впливає на перебіг захворювання. 5-річна виживаність за I стадії становить 95 %, II стадії – 75 %, III стадії – 69 % і за IV стадії – 45 % [71]. Глибина вrostання пухлини у стінку МТ і інтраопераційний розрив пухлини є незалежними прогностичними факторами навіть у разі I стадії захворювання [66,72, 73]. Але запропонована класифікація (табл. 1) не позбавлена недоліків, оскільки в один і той самий показник складається з хворих, неоднорідних за іншими факторами, які мають важливе прогностичне значення.

Розмір залишкової пухлини після хірургічного лікування суттєво впливає на перебіг захворювання [74]. У пацієнтів із III–IV стадією захворювання 5-річна виживаність становить 55 %, якщо залишкова пухлина менше ніж 1 см у діаметрі, порівняно з 21 % – для пацієнтів із великим розміром залишкової пухлини [66,75].

Роль віку за ПРМТ серед інших факторів ризику залишається неоднозначною. Найчастіше пухлини цієї локалізації спостерігаються в 60–64 роки, середній вік хворих одночасно становить 55 років [66,76]. Однак описані випадки ПРМТ у віці 17 і 88 років.

Результати за даним напрямком роботи опубліковані виконавцями науково-дослідної роботи у наступних працях:

Романюк АМ, Гирявенко НІ, Линдін МС, Сікора ВВ. Первинний рак маткових труб : монографія. – Суми : Сумський державний університет, 2019. – 110 с.

2.6 Епідеміологічні аспекти захворюваності на злоякісні пухлини передміхурової залози

Для епідеміологічної оцінки рак передміхурової залози (РПЗ) були проаналізовані показники Національного канцер-реєстру, Сумського обласного канцер-реєстру та відділу статистики Сумського обласного клінічного онкологічного диспансеру за період з 2010 по 2017 роки. Аналіз даних вказує на те, що первинна захворюваність на РПЗ в Україні знаходиться стабільно на високому рівні з тенденцією до зростання (рис. 2.9).

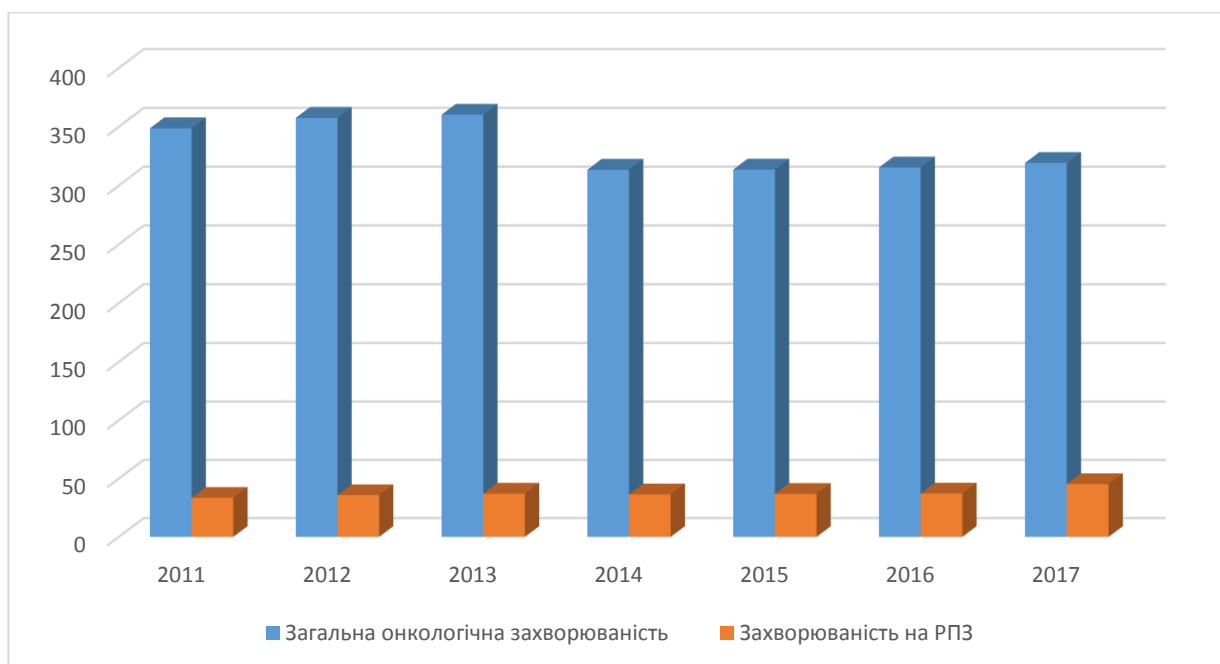


Рисунок 2.9 – Захворюваність на РПЗ та загальна онкологічна захворюваність населення України у 2011-2017 роках (на 100 тис. населення)

Основними причинами зростання захворюваності є підвищення якості надання медичних послуг, впровадження скринінгових програм щодо виявлення РПЗ, широке використання малоінвазивних методів діагностики (серологічне визначення рівня ПСА, УЗД). До факторів, які зумовлюють зростання показників захворюваності також слід віднести погіршення екологічного стану навколишнього середовища, зміну вікової структури населення з тенденцією до переважання старшої вікової групи.

Впродовж 2010-2017 років в Сумській області спостерігався стабільно високий рівень захворюваності на РПЗ, який складав в середньому $34,48 \pm 3,48$ на 100 тис. на селення (табл. 2.1). У порівнянні із загальнодержавним показником ($36,79 \pm 1,39$ випадків на 100 тис. населення) достовірної різниці виявлено не було ($p > 0,05$). Тобто, показник захворюваності на РПЗ серед жителів Сумської області відповідає загальнодержавним показникам, однак також має тенденцію до зростання (рис. 2.10).

Таблиця 1.1 – Рівень первинної захворюваності у районах Сумської області впродовж 2010-2017 років на 100 тис. населення. X_c – середній показник захворюваності, σ – стандартне відхилення, m – середня похибка середнього арифметичного, - – відсутня інформація

№ з/п	Район	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	X_c	σ	m
1	Білопільський	33,20	40,70	49,20	33,20	29,40	17,00	42,90	30,2	34,48	9,85	3,48
2	Буринський	34,20	23,60	56,00	73,40	41,60	50,70	17,20	43,6	42,54	18,02	6,37
3	В. – Писарівський	30,60	30,90	-	42,20	53,50	54,50	44,20	67,1	46,14	13,27	5,02
4	Глухівський	27,80	11,00	11,20	33,80	41,90	34,60	38,90	43,3	30,31	12,83	4,54
5	Конотопський	20,70	8,80	19,50	26,70	25,10	30,60	23,60	43,9	24,86	10,03	3,55
6	Краснопільський	25,90	28,20	35,50	49,90	43,20	36,20	7,30	37,0	32,90	12,85	4,54
7	Кролевецький	24,10	16,10	37,90	27,30	27,60	67,00	33,90	51,5	35,68	16,44	5,81
8	Лебединський	24,60	18,10	18,20	36,90	56,30	42,50	57,20	52,8	38,33	16,52	5,84
9	Л. – Долинський	24,60	31,30	10,60	43,10	21,90	11,10	22,50	68,1	29,15	18,91	6,69
10	Недригайлівський	27,60	24,80	33,50	59,10	34,40	34,80	70,10	44,3	41,08	15,88	5,61
11	Охтирський	25,20	25,70	51,50	14,40	17,30	26,10	29,20	43,9	29,16	12,60	4,46
12	Путивльський	23,30	29,40	-	29,80	-	-	31,10	31,5	29,02	3,31	1,48
13	Роменський	28,60	21,70	30,30	16,90	22,80	37,60	35,30	14,8	26,00	8,31	2,94
14	С. – Будський	27,40	-	12,10	49,00	24,90	75,80	12,70	12,8	30,67	23,82	9,00
15	Сумський	21,30	13,60	20,30	16,90	47,50	40,90	44,20	60,7	33,18	17,32	6,12
16	Тростянецький	32,30	52,20	11,70	11,80	23,80	18,10	67,40	55,7	34,13	21,61	7,64
17	Шосткинський	27,60	24,10	22,00	42,20	51,50	29,40	29,70	48,3	34,35	11,34	4,01
18	Ямпільський	23,80	25,30	51,30	17,30	26,50	44,80	9,10	27,5	28,20	13,75	4,86
19	м. Суми	35,40	37,30	40,80	33,50	32,70	62,30	61,70	56,3	45,00	12,86	4,55
20	Сумська область	27,27	25,70	30,10	34,60	34,60	39,70	35,70	46,2	34,48	9,85	3,48

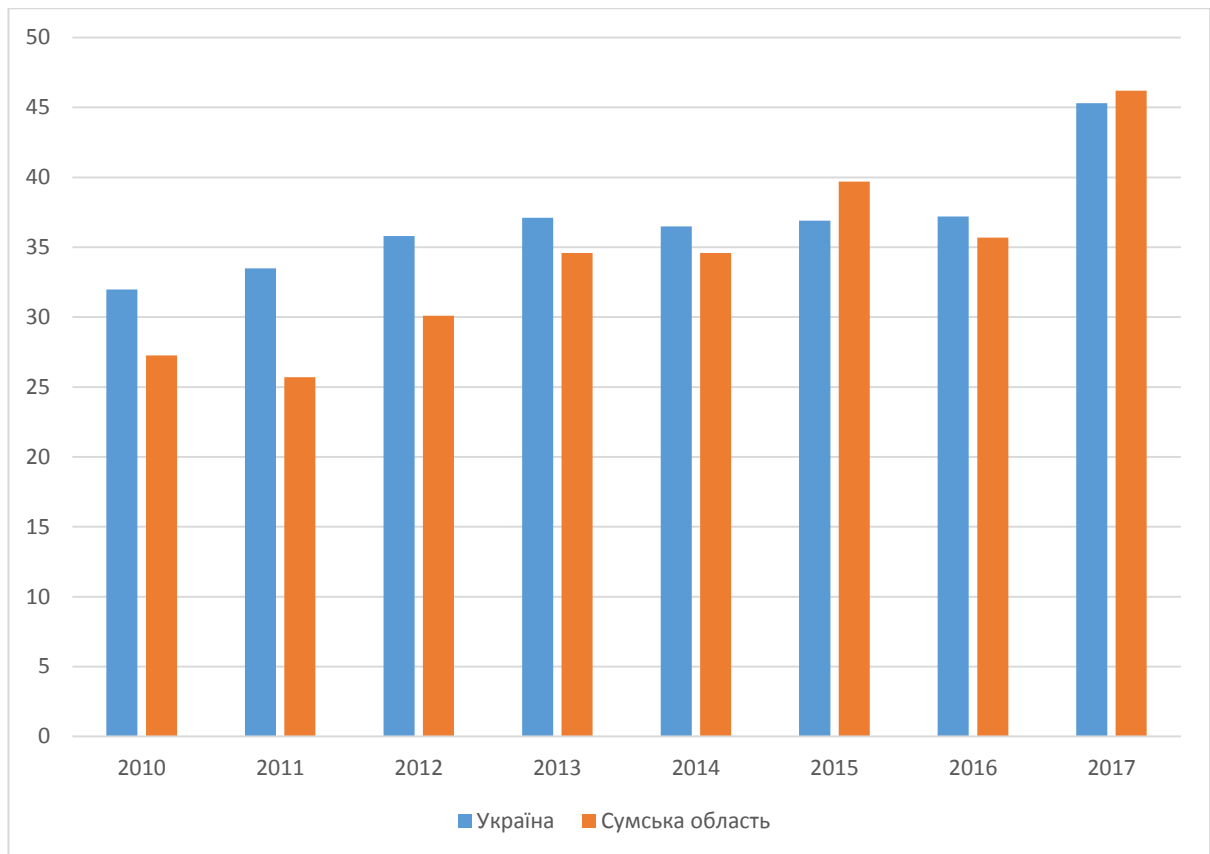


Рисунок 2.10 – Порівняння захворюваності на РПЗ в Україні та Сумській області впродовж 2010-2017 років (на 100 тис. населення), середні показники

До регіонів Сумської області з найвищою захворюваністю на РПЗ належать Великописарівський ($46,14 \pm 5,02$), Буринський ($42,54 \pm 6,37$), Недригайлівський ($41,08 \pm 5,61$), Лебединський ($38,33 \pm 5,84$) райони та м. Суми ($45,00 \pm 4,55$). Середні показники захворюваності на РПЗ у цих районах були вищими за загальнодержавні та поступово зростали впродовж періоду спостереження (2010-2017 рр.). Найнижчим рівнем захворюваності на РПЗ характеризувалися Конотопський ($24,86 \pm 3,55$), Роменський ($26,0 \pm 2,94$), Ямпільський ($28,2 \pm 4,86$), Путивльський ($29,02 \pm 1,48$) та Липоводолинський ($29,15 \pm 6,69$) райони Сумської області (рис. 2.11). Ці регіони також характеризувалися відсутністю значного коливання показників, хоча мали тенденцію до зростання.

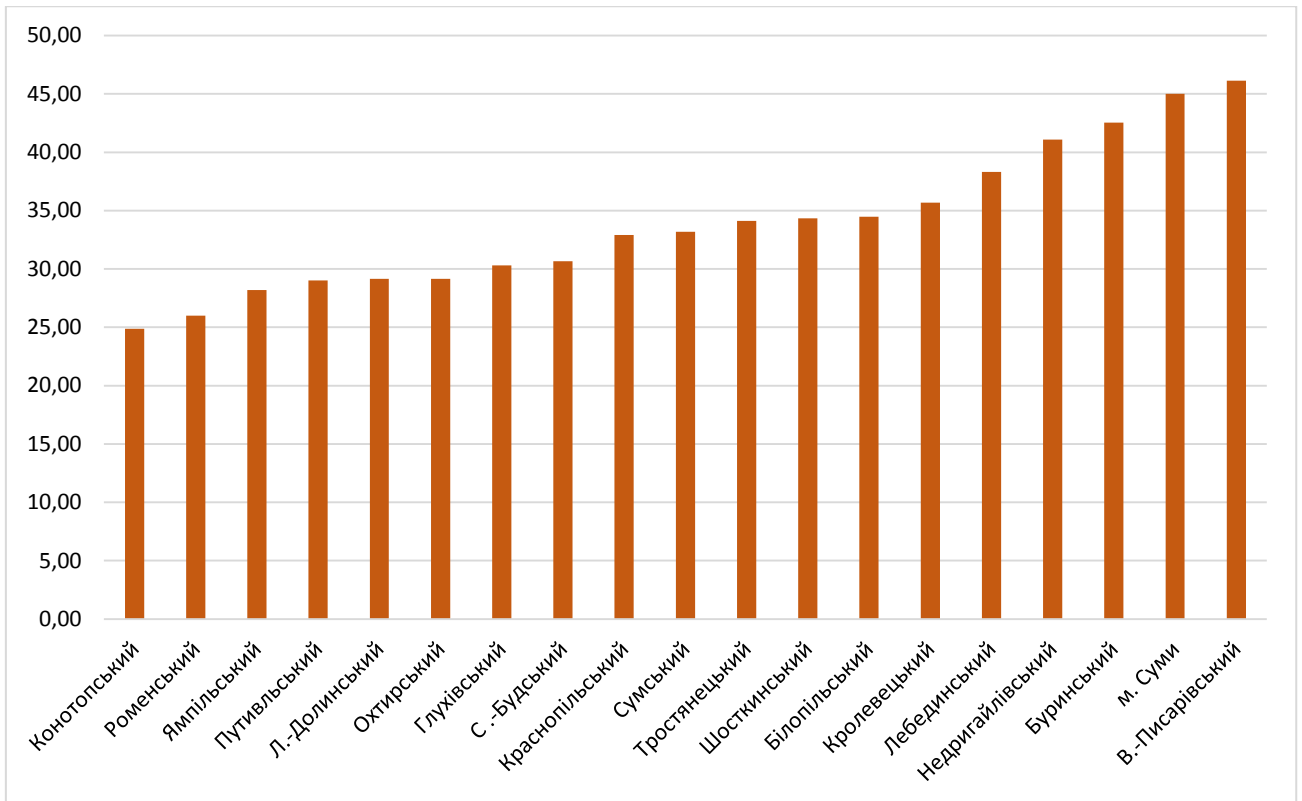


Рисунок 2.11 – Середні показники захворюваності на РПЗ в Сумській області у 2010-2017 рр. (на 100 тис.населення).

За даними Національного канцер-реєстру України, за період з 2010 по 2017 роки в Сумській області було зареєстровано 1418 нових випадків РПЗ (в середньому $177,25 \pm 12,55$ випадків на 100 тис. населення у рік).

Аналіз кількісних показників захворюваності на РПЗ серед районів Сумської області вказує на значну неоднорідність та варіабельність цих величин. Хоча Сумська область характеризується нижчим середнім рівнем захворюваності на РПЗ у порівнянні із загальнодержавними показниками, однак впродовж періоду спостереження дана різниця скорочується і у 2017 році цей показник був вищим за національний. Географічні відмінності між регіонами, концентрація хімічної та машинобудівної промисловості у південній частині Сумщини, а також відмінності у соціально-демографічному супроводі населення та їх комбінація можуть обумовити різницю рівнів захворюваності на РПЗ між районами Сумської області.

Результати за даним напрямком роботи опубліковані виконавцями науково-дослідної роботи у наступних працях:

Дисертація кандидата медичних наук: Піддубний Артем Михайлович, «Патоморфологічна характеристика біомінералізації при раку передміхурової залози», спеціальність 14.03.02 – патологічна анатомія, науковий керівник – д.мед.н., доц. Москаленко Р.А., 2020, Запорізький державний медичний університет

Таким чином, нами був проаналізований епідеміологічний статус ракових захворювань серед регіонів України та Сумської області. Були виявлені тренди у динаміці захворюваності, а також їхня територіальна залежність. Порівняння даного показника в Сумській області показало його відповідність до загальнодержавних значень. Також простежується динаміка до поступового зростання рівня захворюваності на злокісних новоутворення основних локалізацій як серед усіх регіонів Сумської області, так і України.

3 РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Особливості імуногістохімічної 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 [77].

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 вугледобувною промисловістю. Осередкові утворення легень виявляються в 19-25% випадків всіх патологічних змін у легенях, при цьому 40% осередкових патологічних утворень легень виявляються злоякісними [88]. 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 [79]. 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 [80].

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 [81].

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. 3.1).

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 [82-84].

З усіх пухлиноподібних уражень найбільш схожими з доброякісними пухлинами легень [51,52,83-86] 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 Тутона. 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 [51,52].

Таблиця 3.1 – Найпоширеніші доброякісні пухлини легень

Різновид 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, жирові й судинні структури.	пухлина складається із зародкової тканини, округленої форми, капсула відсутня, але пухлина чітко відмежована від оточуючих тканин.	містить клітини залозистого епітелію, жирової, лімфоїдної, хрящової тканин, сполучнотканинні волокна, судинні елементи, скупчення остеоцитів.

Продовження таблиці 3.1

Папілома	великі бронхи	епітеліальна тканина бронхів	пухлина з дольчатою поверхнею, рожево- червоного кольору, із строми, з множинними виросами, зовні покритими епітелієм.	з плоского / перехідного епітелію, з добре вираженою стромою.
Фіброма	великі бронхи і периферичні ділянки легень.	мезодермаль не 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 веретенопо дібну форму, формують пучки, що йдуть в різних напрямах.
Тератома	завжди периферичної локалізації, найчастіше - у верхній долі лівої легені	розвивається з ембріональн их клітин.	капсульоване, кістозне утворення, містить сальні маси, волосся, зуби, хрящі та ін.	скупчення клітин зародкових листоків

Продовження таблиці 3.1

Судинні пухлини (гемангіо-ендотеліома, гемангіо-перидитома, капілярна і кавернозна гемангіоми легень, лімфангіома)	периферичної/центральної локалізації	ендотелій судин	пухлини округлої форми рожево-червоного кольору, щільні, з капсулою.	скупчення ендотеліальних клітин, волокна із сполучної тканини, перидити.
Неврогенні доброякісні пухлини легень (невриноми (шваноми), нейрофіброми, хемодектоми)	найчастіше периферичної локалізації, іноді розташовуються одночасно в обох легенях.	з нервової тканини	округлі щільні вузли сіро-жовтого кольору з капсулою.	тяжі клітин, що переплітаються, Шванівські елементи, клітини хеморецепторів, сполучно-тканинні перетинки із судинами

На теперішній час спектр досліджень, пов'язаних з встановленням онкологічного діагнозу, включає об'єктивне обстеження пацієнтів, лабораторне дослідження біологічних рідин, інструментальні дослідження, морфологічне дослідження післяопераційного матеріалу та встановлення молекулярно-генетичних особливостей пухлинної тканини. Але значні труднощі виникають при важкодоступних локалізаціях пухлинного процесу. Більш того, наявність при гістологічному дослідженні біопсійного та післяопераційного матеріалу доволі важко оцінити ступінь злоякісності пухлини у зв'язку з відсутністю можливості верифікації чутливості до специфічної імуногістохімічної панелі. Саме тому використання

іммуногістохімічних досліджень з визначенням специфічних патернів у тканинах набули значної актуальності у наукових дослідженнях[51,52].

У процесі лікування під впливом хіміо- та імунотерапії відбувається масивне руйнування пухлинних клітин і виділення їх компонентів у кровообіг, що полегшує виділення та ідентифікацію пухлинних НК з наявними мутаціями. Нові мутації у пухлинних клітинах, які виникають уже в процесі лікування, можуть бути легко виявлені за допомогою технології «liquid biopsy», що дозволить відповідно скоригувати протипухлинне лікування [38].

Не зважаючи на покращення загальної виживаності пацієнтів після використання хіміотерапії на основі платини, прогноз досі залишається несприятливим, особливо для пацієнтів із запущеними стадіями. Медіана виживаності складає від 8 до 12 місяців [87,88]. Але за останнє десятиліття погляди на лікування хворих з IV стадією стали більш оптимістичними. На даний час багато пацієнтів отримують менш токсичну терапію, завдяки якій є можливість краще контролювати хворобу. Таких результатів вдається досягати завдяки персоналізації лікування. Якщо раніше, для того, щоб призначити режим хіміотерапії, достатнім було проведення гістологічного дослідження, то, наразі, необхідним є іммуногістохімічне визначення наявності специфічних біомаркерних білків у тканинах і біологічних рідинах. Для злоякісних пухлин легенів проводять визначення мутацій генів EGFR, ALK, ROS1 та експресії PD-L1 рецепторів [88,89].

Для пацієнтів з аденокарциномою чи недрібноклітинною пухлиною, у якій неможливо виключити наявність аденокарциномного компоненту, важливим є проведення аналізу на визначення наявності EGFR, ALK та ROS1 мутацій. Хоча EGFR та ALK геномні аберації зрідка зустрічаються і в плоскоклітинних карциномах, тестування в рамках рутинної практики не рекомендується у зв'язку з низькою частотою цієї патології та дороговартістю дослідження [88,90].

В останні роки велика увага приділяється дослідженню експресії рецепторів PD-L1. Таке тестування пухлинної тканини потрібно для усіх типів недрібноклітинного РЛ. У лікарів і медичного персоналу відсутнє чітке розуміння значення білка програмованої клітинної смерті (PD-L1) та важливості цього процесу для обрання лікувальної тактики для пацієнтів, хворих на РЛ [91].

PD1 – це мембранний білок сімейства імуноглобулінів, що відіграє роль під час клітинного диференціювання імунних клітин. PD-1 відіграє важливу роль в негативній регуляції імунної системи за допомогою запобігання активації Т-лімфоцитів, що знижує аутоімунність та підвищує ауто толерантність. Інгібіторний ефект PD-1 здійснюється через подвійний механізм стимуляції апоптозу (запрограмованої смерті клітин) антигенспецифічних Т-лімфоцитів в лімфатичних вузлах, в той час як апоптоз регуляторних (обмежувальних) Т-лімфоцитів, навпаки, знижується. Цей білок має два ліганда: PD-L1 і PD-L2, які входять до сімейства білків B7. У відповідь на дію ліпополісахариду і гранулоцитарно-макрофагального колонієстимулюючого фактора (GM-CSF) збільшується експресія ліганду PD-L1 на макрофагах і дендритних клітинах. Т- і В-лімфоцити експресують цей білок у відповідь на активацію Т-клітинного і В-клітинного рецептора. PD-L2 здебільшого експресується на APCs (білок, який кодується однойменним геном, розташованим у людей на короткому плечі 1-ї хромосоми), в той час як PD-L1 можуть бути на Т-лімфоцитах, епітеліальних та ендотеліальних клітинах. Гомологічність цих лігандів складає 37%. PD-L1 грає роль у пізній фазі імунної відповіді, зокрема при запальних процесах у тканині регулює функцію Т-клітин і попереджає розвиток аутоімунних процесів. В пухлинній тканині PD-L1 регулюється TILs (Tumor-infiltrating lymphocytes), що в свою чергу є лейкоцитами, що вийшли з крові та мігрували в пухлину. Вони включають Т- та В-лімфоцити, які входять до більшої категорії "інфільтруючих пухлину імунних клітин", а також природних кілерів, макрофагів, нейтрофілів, дендритних клітин, еозинофілів,

базофілів та ін. у різних пропорціях. Їх кількість залежить від типу і стадії пухлини. Наявність PD-L1 рецепторів часто пов'язане з поганим прогнозом [88,91]. Саме тому дуже важливим є індивідуальний підхід до кожного окремого випадку захворювання на РЛ. Варіанти лікування та тестування на біомаркери постійно змінюються, але групою вчених розроблений алгоритм, яким можна керуватися при виборі першої лінії терапії, підтримуючої терапії, другої/третьої лінії терапії в залежності від рівня PD-L1 експресії в пухлинній тканині та наявності EGFR, ALK та ROS1 мутацій (Рис. 3.1) [88,92].

PD-L1 експресія – це оцінювання частки пухлинних клітин TPS (tumor proportion score), що пофарбувалися відносно всіх пухлинних клітин у досліджуваній секції. Під час оцінювання не зараховуються пофарбовані здорові та некротизовані клітини. В залежності від рівня PD-L1 експресії пухлини розділяють на 3 групи:

- 1) PD-L1 < 1% TPS;
- 2) PD-L1 1 - 49 % TPS;
- 3) PD-L1 > 50% TPS.

Для пацієнтів, у яких рівень експресії PD-L1-рецепторів складає більше 50% TPS у якості першої лінії терапії рекомендовано використовувати пембролізумаб, в той час як при експресії 1-49 % цей препарат рекомендується лише у якості другої лінії [93]. Це твердження стосується як аденокарцином, так і плоскоклітинних пухлин. Пембролізумаб - це гуманізоване антитіло, що застосовується при імунотерапії. Механізм дії полягає в блокуванні PD-L1 лігандів на Т-клітинах, результатом чого є активація пухлиноспецифічних цитотоксичних Т-клітин і знищення ними ракових клітин. Food and Drug Administration (FDA) спочатку затвердив його для лікування метастатичної меланоми, вже у 2017 році – для лікування метастатичного недрібноклітинного РЛ. Ефективність та безпечність пембролізумабу в якості препарату першої лінії терапії було оцінено у дослідженні KEYNOTE-001. Безрецидивний та загальний період виживаності

пацієнтів склали 6.2 та 22.1 місяці відповідно. Високий рівень PD-L1 експресії був пов'язаний із збільшенням виживаності. Так, у пацієнтів, які приймали участь у клінічному дослідженні та мали PD-L1 експресію 50% або більше, безрецидивний період становив близько 12.5 місяців. І навпаки, при рівні експресії 1-49% цей часовий проміжок складав лише 4.2 місяці [88,94].

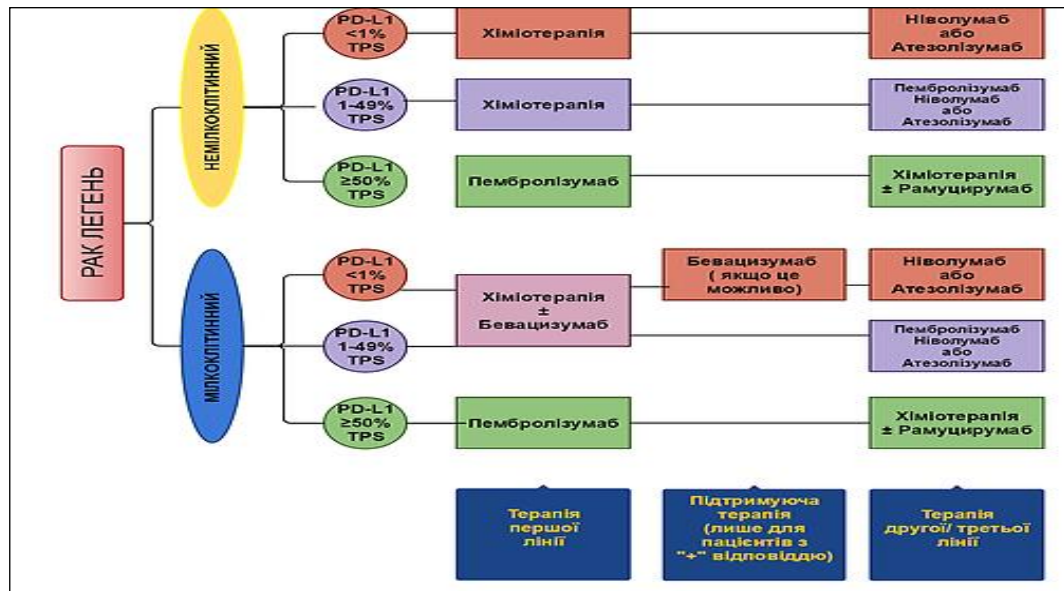


Рисунок 3.1 – Стандартизований алгоритм лікування хворих на немілкоклітинний рак легень, PD-L1 – ліганд програмованої смерті клітин – 1, TPS – оцінювання частки пухлинних клітин

У дослідженні III фази для лікування метастатичного недрібноклітинного РЛ KEYNOTE-024 було вперше продемонстровано перевагу анти-PD-L1 терапії над стандартною хіміотерапією на основі платини [95]. Взагалі вважається, що для пацієнтів з недрібноклітинним раком легень, які не мають EGFR, ALK та ROS1 мутацій та отримали першу чи другу лінію хіміотерапії, визначення наявності PD-L1 експресії потрібне лише у разі призначення пембrolіумабу.

У якості другої/третьої лінії терапії за наявності PD-L1 експресії 50% та більше TPS доцільним вважається використання стандартної хіміотерапії та рамуцирумаба. Рамуцирумаб – це моноклональне антитіло людини (IgG1) проти рецептора 2 фактора росту ендотелію судин (VEGFR2), рецептора

тирозинкінази трансмембранного типу II, експресованого на ендотеліальних клітинах. При взаємодії з VEGFR2 препарат перешкоджає зв'язуванню його лігандів (VEGF-A, VEGF-C і VEGF-D), тим самим запобігаючи фосфорилуванню рецептора, стимульованого VEGF, та проліферації, а також знижує проникність та міграцію ендотеліальних клітин людини, індукованих лігандом [88,96].

Для лікування пацієнтів з рівнем експресії PD-L1 рецепторів від 1 до 49% TPS в якості першої лінії терапії використовується стандартна хіміотерапія, що схвалена для різних гістологічних варіантів пухлин. Крім того, для аденокарцином рекомендується додатково застосовувати бевацизумаб [92]. Цей препарат не являється представником імунотерапевтичних засобів, а є генно-інженерним рекомбінантним гуманізованим моноклональним антитілом до фактора росту ендотелію судин VEGF-A. Механізм дії препарату полягає у зв'язуванні із фактором росту ендотелію судин, що призводить до блокування зв'язування з його рецептором. Наслідком цього є пригнічення васкуляризації ділянок із високою швидкістю росту. Оскільки такі властивості характерні для злоякісних пухлин, то бевацизумаб у першу чергу пригнічує васкуляризацію пухлини, її ріст та метастазування [97]. Бевацизумаб може використовуватися в якості підтримуючого лікування у разі, якщо спостерігається ефект.

Для другої/третьої лінії терапії пацієнтів з рівнем PD-L1 експресії 1-49% TPS рекомендується використовувати пембролізумаб, ніволумаб або атезолізумаб. За механізмом своєї дії ніволумаб схожий з пембролізумабом і являє собою людський імуноглобулін G4 анти-PD-1 моноклональне антитіло. Пухлинні клітини РЛ здатні продукувати рецептори PD-L1, які захищають їх від Т-лімфоцитів. Ніволумаб блокує зв'язування PD-L1 з PD-1, що залишає Т-лімфоцити активними. У дослідженні III фази пацієнтів з метастатичним недрібноклітинним раком легенів, які отримували доцетаксел або ніволумаб в режимі монотерапії, доведено, що ніволумаб демонструє значно кращі

результати щодо 1-річної виживаності хворих. Доведено, що із збільшенням рівня експресії PD-L1 подовжується безрецидивний період [88,98,99].

У дослідженні III фази пацієнтів з метастатичним, попередньо лікованим недрібноклітинним раком легенів, які були рандомізовані у дві групи, загальна виживаність пацієнтів була значно вищою при застосуванні атезоліумабу (13.8 проти 9.6 місяців). Після цього FDA схвалила атезоліумаб у якості другої лінії терапії метастатичного недрібноклітинного РЛ [99].

Для лікування пацієнтів з рівнем експресії PD-L1 менше 1% TPS в якості першої лінії терапії рекомендується використовувати стандартну хіміотерапію (для аденокарцином – разом з бевацизумабом), а для другої/третьої – ніволумаб чи атезоліумаб [92,99].

Ще одним представником блокаторів PD-L1 рецепторів є препарат дурвалумаб. Під час дослідження II фази у пацієнтів з метастатичним недрібноклітинним раком легенів, які вже отримали щонайменше 2 лінії системної хіміотерапії, вдалося довести, що зі збільшенням PD-L1 експресії покращуються показники однорічної виживаності: 34.5% (при рівні експресії менше 25%), 47.7% (при рівні експресії більше 25%), 50.8% (при рівні експресії більше 90%) [100].

Найсучаснішим PD-L1 блокатором вважається авелумаб, який подає великі надії для пацієнтів, які зазнали прогресії після терапії препаратами на основі платини. Серед пацієнтів, що лікувалися авелумабом в якості першої лінії терапії, показник загальної відповіді і показник контролю хвороби були на рівні 18.7% та 64% відповідно [101]. Однак дана методика лікування також може нести за собою непередбачувані наслідки. Так, імунотерапія може стати причиною розвитку ауто реактивності шляхом впливу на імунологічні контрольні точки, що є регуляторами імунної системи. Ці шляхи мають вирішальне значення для несприйнятливості імунної системи до речовин або тканин, які мають здатність викликати імунну відповідь у даного організму, що не дозволяє імунній системі без розбору нападати на

власні клітини. Молекули інгібіторної контрольної точки є мішенями для імунотерапії раку. В даний час схвалені інгібітори контрольних точок блокують CTLA4, PD-1 і PD-L1. За відповідні фундаментальні наукові відкриття Джеймс П. Еллісон і Тасуку Хондзо у 2018 році отримали Нобелівську премію з фізіології та медицини [88,96].

Баланс між імунною толерантністю та імунною реактивністю підтримується завдяки Т-лімфоцитам. Для їх активації потрібен як антиген, так і інший сигнал, який відправляється через такі молекули, як CD28. При зв'язуванні з молекулами B7, такими як CD80 (B7-1) або CD86 (B7-2), корецептори CD28 на Т-клітинах забезпечують позитивний стимуляторний сигнал. В той же час молекули CTLA-4 забезпечують негативний інгібуючий сигнал. PD-1, як і CTLA-4, належить до сімейства CD28 і видає негативний сигнал при взаємодії з його лігандами, PD-L1 (B7-H1 або CD274) і PD-L2 (B7-DC або CD273), які належать до сімейства B7 [96].

Іншими етіологічними факторами розвитку аутоімунного ураження є високий рівень експресії CTLA-4 та PD-1 на регуляторних CD4 + CD25 + Т-лімфоцитах. Саме вони приймають участь у підтримці механізмів периферичної імунної толерантності. Активація цих рецепторів попереджує зрив імунної толерантності до власних клітин організму шляхом стимуляції проліферації регуляторних Т-клітин. Особливістю багатьох пухлин є те, що вони інфільтровані регуляторними Т-лімфоцитами. Блокада їх активності за допомогою атезолізумабу сприяє посиленню протипухлинної імунної відповіді шляхом усунення імуносупресії, що є наслідком впливу регуляторних Т-лімфоцитів. З іншого боку, надмірне пригнічення цих клітин, призводить до зриву імунної толерантності та розвитку аутоімунних процесів, зокрема і в шкірі [88,99].

Так, нами було описано випадок [97], коли пацієнт отримував лікування в Сумському онкологічному диспансері з приводу злоякісного новоутворення верхньої частки правої легені. Від самого початку була встановлена IV стадія захворювання. На момент виникнення бульозного

пемфігоїду хвороба вже 24 місяці вдало піддавалася лікуванню. За увесь період спостереження пацієнт отримав 6 курсів хіміотерапії за схемою: паклітаксел 100 мг/м^2 + карбоплатин (AUC 6) + Атезоліумаб 1200 мг в/в краплинно кожні 3 тижні. Оскільки була зареєстрована часткова відповідь на лікування та відсутність прогресії захворювання, пацієнт перейшов в режим монотерапії препаратом атезоліумаб у дозі 1200 мг в/в краплинно кожні 3 тижні. Небажане явище у вигляді бульозного пемфігоїду Лєвера виникло після 33-го введення PD-L блокатора. На 20-й день після інфузії препарату хворий поскаржився на появу 2 еритематозних плям у лівій надключичній ділянці та 1 плями у міжпальцевому проміжку на правій кисті. Плями були розміром приблизно $2 \times 1.5 \text{ см}$, яскраво рожевого кольору, мав місце незначний зуд. Явище було трактовано як алергія. На 21-й день проведено планову інфузію препарату Атезоліумаб (34-й цикл). На 4-й день після введення у пацієнта з'явилися нові множинні еритематозні плями у правій та лівій надключичних ділянках, міжпальцевих проміжках обох рук, паховій ділянці, на статевих органах та нижній частині живота. Нами було встановлено, що дана патологія виникла внаслідок прийому PD-L блокатора атезоліумаба [97-99].

Крім того, активно проводяться дослідження щодо ефективності використання CTLA-4 разом з PD-1/PD-L1 інгібіторами. CTLA-4 (цитотоксичний Т-лімфоцитарний асоційований білок 4), також відомий як CD152 (кластер диференціювання 152), є білковим рецептором, який функціонує як імунна контрольна точка та знижує імунну відповідь. Представниками цих препаратів є іпілімуаб і тремілімуаб. Наразі триває рандомізоване дослідження III фази, у якому порівнюється ефективність комбінації ніволумабу з іпілімуабом проти використання ніволумабу в режимі монотерапії та ніволумабу з хіміотерапією на основі препаратів платини [102]. Дурвалумаб разом з CTLA-4 інгібітором тремілімуабом випробовується в Ib фазі дослідження пацієнтів з метастатичним недрібноклітинним раком легенів [103].

На підставі вивчення даних літератури та сучасних протоколів лікування нами було відібрано найнеобхідніші маркери скринінгової діагностики пухлинної тканини (білків проліферативно-апоптозного циклу, EGFR, KRAS, PDL1, ALK1 та інших) з повним теоретичним обґрунтуванням їх показників для регуляції прогресування неопластичних клітин. У 2018 році проведено закупівлю даних імуногістохімічних маркерів, що в поєднанні з наявними антитілами дозволить встановити чіткі критерії скринінгової діагностики пухлин від чого і буде залежати подальше лікування. Аналізуючи дані, отримані при дослідженні пухлинної тканини та «liquid biopsy», ми сподіваємося виявити залежність між наявністю мутацій вільно циркулюючих ДНК та молекулярно-генетичним профілем пухлинних клітин. Проведення скринінгу пацієнтів з недрібноклітинним раком легень на наявність рецепторів EGFR, KRAS, PDL1, ALK1 є важливою умовою для персоналізації лікування хворих. Це дозволить покращити якість діагностики та лікування таких пацієнтів, покращить їх загальний та безрецидивний період виживаності. Запровадження EGFR, KRAS, PDL1, ALK1 тестування наблизить лікувальний менеджмент недрібноклітинного РЛ до світових стандартів [38,88,97].

3.1.1 Дослідження експресії PD-L1 у тканині раку легень та вибір тактики лікування

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 біопсією. 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. 3.2) [88,97,98].

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 [97,98].

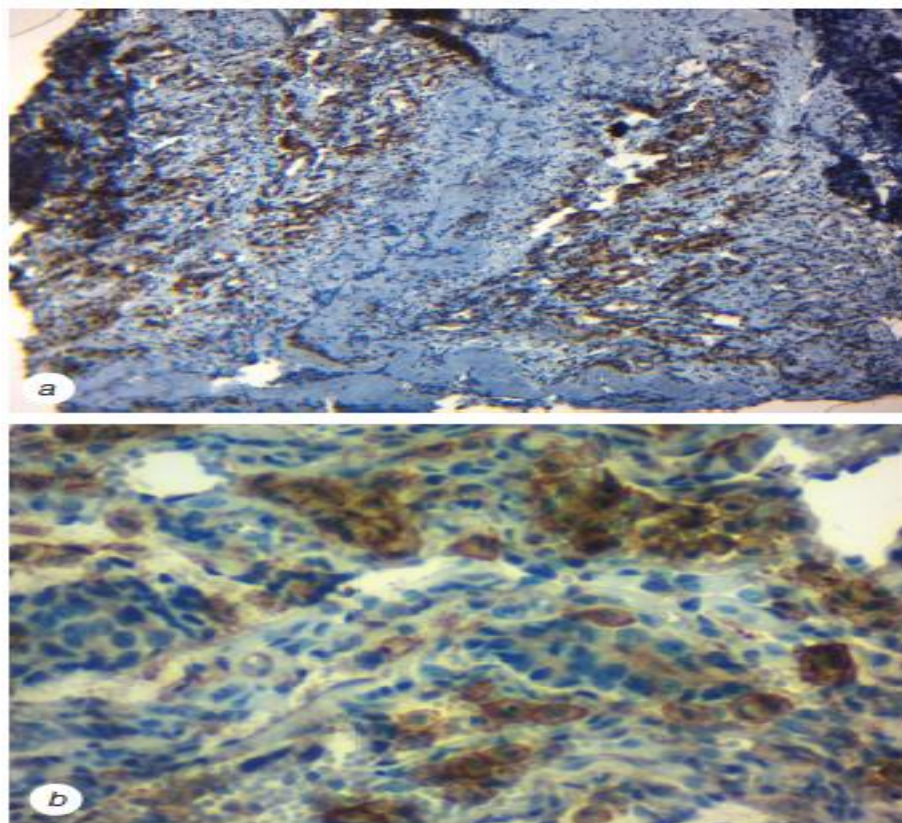


Рисунок 3.2 – Дрібноклітинний рак легень. Імуногістохімічна реакція з антитілами проти рецептора PD-L1, візуалізація за допомогою хромогену DAB, дофарбування ядер гематоксилином Майєра. Збільшення: *a* — $\times 100$, *b* — $\times 400$.

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/м², 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 [97,98].

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% CI 15,3-22,1) в групі лікування пембролізумабом, порівняно із 13,0 місяцями (95% CI 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% CI 13,9-19,7) в групі лікування пембролізумабом в порівнянні із 12,1 місяцями (95% CI 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 [98].

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% CI 5,9-9,0) в групі лікування пембролізумабом та 6,4 місяців (95% CI 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% CI 34-45) із 229 пацієнтів в групі лікування пембролізумабом та у 96 (32%, 95% CI 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% CI 29-38) із 413 та 117 (29%, 95% CI 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 відмові 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 [98].

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 гіпотіроїдизм (69, або 11%) в групі лікування пембролізумабом та анемія (229, або 37%) в групі лікування хіміотерапією.

Вживання без прогресування, первинна кінцева точка KEYNOTE-024, з меншою ймовірністю вплине на кросовер, ніж загальна виживаність, яка була основною кінцевою точкою KEYNOTE-042, а отже, чому не дозволено кросовер KEYNOTE-042. Навіть після того, як результати KEYNOTE-024 показали користь для пацієнтів із PD-L1 TPS 50% або більше, ми вирішили не вводити кросинговер у KEYNOTE-042. Нам довелося б обмежити кросинговери пацієнтами з TPS 50% або більше, оскільки користь була показана лише у цій популяції, а кросовер можна було б дозволити лише для частини дослідження. Обидва ці фактори створили б проблеми для дослідження та інтерпретації даних. Загалом, використання інших наступних методів терапії у цьому дослідженні є більш репрезентативним для реальної клінічної практики, де менше половини пацієнтів отримують лікування другої лінії або пізніше. 19,20

На час другого проміжного аналізу пембролізумаб істотно не продовжував виживання без прогресування у популяції PD-L1 TPS 50% або більше, а за ієрархічним планом статистичного аналізу гіпотези виживання без прогресування в TPS 20% або більші та 1% або більше популяцій офіційно не тестувались. Хоча значні переваги виживання без прогресування не завжди супроводжують суттєві загальні переваги виживання у дослідженнях інгібіторів імунних контрольних точок, 9,21–24 відсутність цієї користі у популяції TPS 50% і більше була дещо несподіваною, враховуючи значну користь, яку спостерігали у KEYNOTE -024,10.

У порівнянні з пембролізумабом у цьому дослідженні інгібітор PD-1 рівнялумаб не суттєво покращив загальну виживаність порівняно з хіміотерапією платиною-дублетом у дослідженні CheckMate 026 фази 3 у пацієнтів з метастатичним або рецидивуючим недрібноклітинним раком легенів на PD-L1. У первинному аналізі CheckMate 026, який включав пацієнтів з рівнем експресії PD-L1 5% або більше, як визначено з використанням антитіла, середня загальна виживаність становила 14-4 місяці (95% ДІ 11 · 7–17 · 4) з рівеньлумабом та 13 · 2 місяці (10 · 7–17 · 1) при хіміотерапії, а показник ЧСС становив 1,02 (95% ДІ 0 · 80–1 · 30). Також не було загальної переваги виживання серед дослідницької популяції пацієнтів з рівнем експресії PD-L1 на 50% більшим (HR 0 · 90, 95% ДІ 0 · 63–1 · 29). Порівнюючи результати KEYNOTE-042 та CheckMate 026, слід зазначити, що CheckMate 026 дозволив кросинговер після прогресування захворювання, тоді як KEYNOTE-042 - ні. Загалом 60% пацієнтів у групі хіміотерапії отримували подальший рівеньлумаб, що могло зменшити ефект лікування рівнялумабом порівняно з хіміотерапією. Результати рандомізованих, подвійних сліпих досліджень фази 3 KEYNOTE-189 та KEYNOTE-40717,25 показали, що пембролізумаб у поєднанні зі стандартною хіміотерапією платиновим дублетом значно подовжує загальну виживаність та виживання без прогресування, порівняно з однією лише хіміотерапією. терапія першого ряду у пацієнтів з метастатичним неквамозним та плоскоклітинним недрібноклітинним раком легенів, незалежно від PD-L1 TPS [98].

Хоча пембролізумаб та хіміотерапія можуть мати більшу ефективність, ніж сам пембролізумаб, у пацієнтів з пухлинами, що експресують PD-L1, особливо у тих, у кого рівень експресії PD-L1 нижчий, остаточного висновку неможливо зробити без прямого перспективного порівняння. Зрештою, вибір методу лікування повинен визначатись індивідуально після дискусії між лікарем та пацієнтом щодо ризиків та переваг кожного варіанту та виходячи з конкретних для пацієнта факторів.

Профілі безпеки пембролізумабу та хіміотерапії у цьому дослідженні, як правило, узгоджувались із профілями попередніх звітів, не виявляючи нових сигналів безпеки. Незважаючи на більший вплив лікування пембролізумабом у групі, ніж у групі хіміотерапії, побічних ефектів, пов'язаних із лікуванням 3 ступеня або гірше, було менше. Пневмоніт спостерігався у 8% пацієнтів, але події ступеня тяжкості 3 або гіршого ступеня становили менше половини випадків (захворюваність 3%). Що важливо, лише один пацієнт помер через пневмоніт. У цього пацієнта було кілька супутніх захворювань, включаючи хронічну обструктивну хворобу легень та двосторонню бронхоальвеолярну консолідацію, а також прогресування захворювання [98].

Обмеженням цього дослідження є відкритий дизайн, який, ймовірно, пояснює, чому 22 пацієнти, рандомізовані до групи хіміотерапії, не отримували хіміотерапії за призначенням. Ці пацієнти, можливо, отримували імунотерапію як терапію першої лінії, що могло б зменшити користь пембролізумабу порівняно з хіміотерапією. Іншим можливим обмеженням цього дослідження є те, що лише 66% пацієнтів з неквамозною гістологією в групі хіміотерапії отримували підтримуючу терапію пеметрекседом після завершення принаймні чотирьох циклів платиново-дублетної хіміотерапії. Незважаючи на будь-які занепокоєння щодо субоптимальної терапії у пацієнтів з несквомозною гістологією у групі хіміотерапії, результати були подібними до тих, що повідомлялись раніше про хіміотерапію при недрібноклітинному раку легенів. загальної виживаності та була пов'язана з меншою кількістю побічних явищ, пов'язаних із лікуванням, ніж хіміотерапія на основі платини у пацієнтів з локально поширеним або метастатичним недрібноклітинним раком легенів без сенсibiliзації мутацій EGFR або транслокації ALK і пухлини яких експресували PD-L1 принаймні на 1% клітин.

Результати дослідження KEYNOTE-042, в якому загальна виживаність була основною кінцевою точкою, підтверджують роль монотерапії

пембролізумабом як стандартного першочергового лікування недрібноклітинного раку легенів з високою експресією PD-L1 та припускають, що це розумний варіант лікування для пацієнтів з нижчим рівнем експресії PD-L1. 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 немілкоклітинним 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 [98].

3.1.2 Особливості лікування запущеного дрібноклітинного раку легенів: препарати першої лінії

Дрібноклітинний рак легенів (SCLC) становить 13–17% від усіх діагностованих випадків раку легенів і характеризується швидкою проліферацією, високою часткою росту та раннім розвитком широко поширених метастазів [104,105]. Менше 7% пацієнтів з SCLC залишатися в живих через 5 років після встановлення діагнозу [105,106]. Запущена стадія SCLC становить приблизно дві третини всіх випадків SCLC [104]. Більше трьох десятиліть стандартне лікування першої лінії складалося з етопозиду плюс цисплатин, або карбоплатин (платина-етопозид), з кількома альтернативами. [107-110]. Незважаючи на початкові показники відповіді до 78% у пацієнтів, які отримували платину-етопозид [111,112], більшість пацієнтів рецидивують протягом 6 місяців після завершення початкового лікування та середня загальна виживаність становить близько 10 місяців. [107,111,113]. За межами Японії нинішнім стандартним лікуванням в умовах другої лінії є топотекан [108,109], який пов'язаний з поганими результатами (рівень відповіді 5% та 1-річна виживаність 9% у пацієнтів із

платинорезистентним захворюванням) [114], наголошуючи на значній незадоволеній потребі у вдосконаленні методів лікування першої лінії.

Імуноterapia, спрямована на шлях запрограмованої клітинної смерті 1 (PD-1, також відомий як PDCD1) та ліганда запрограмованої клітинної смерті 1 (PD-L1, також відомий як CD274), продемонструвала клінічну активність для пацієнтів із запущеним SCLC, у тому числі як лікування першої лінії [115]. Дурвалумаб - селективне високоафінне моноклональне антитіло IgG1 людини, яке блокує зв'язування PD-L1 з PD-1 та CD80 [116], призначене для лікування пацієнтів з нерезектабельним недрібноклітинним раком легенів 3 стадії після платиновмісної хіміотерапії [117-120]. У клінічних випробуваннях на ранніх стадіях дурвалумаб як у вигляді монотерапії, так і в комбінації з антицитотоксичним Т-лімфоцит-асоційованим антитиген-4 антитілом, тремеліумабом, продемонстрував тривалу клінічну активність та керований профіль безпеки у пацієнтів із попередньо лікованим EC -SCLC, в тому числі з рецидивом або рефрактерною хворобою [121-123].

У CASPIAN ми оцінювали ефективність та безпеку дурвалумабу з тремеліумабом або без, у комбінації з платиною – етопозидом для лікування першої лінії пацієнтів з запущеним SCLC. Ми повідомляємо результати запланованого проміжного аналізу загальної виживаності для дурвалумабу плюс платина – етопозид проти платини – етопозиду; порівняння дурвалумаб плюс тремеліумаб плюс платина – етопозид з платиною – етопозидом переходить до остаточного аналізу [124].

Дизайн дослідження

Це рандомізоване, відкрите, засліплене для спонсорів випробування фази 3 проводилось на 209 центрах у 23 країнах Європи, Азії, Північної Америки та Південної Америки. Дослідження було проведено відповідно до Міжнародної конференції з гармонізації рекомендацій щодо належної клінічної практики, Гельсінської декларації та чинних місцевих нормативних актів із схваленням незалежного комітету з етики або експертних комісій

установ. Протокол та всі зміни були схвалені відповідними комісіями з питань етики та контролюючими органами.

Пацієнти були в віці не менше 18 років (20 років у Японії) з гістологічно або цитологічним підтвердженням запущеним SCLC, які не отримували лікування. Іншими критеріями відбору були оцінка загального статусу BOOЗ 0 або 1; вимірювана хвороба відповідно до критеріїв оцінки відповіді при твердих пухлинах (RECIST) версія 1.1; тривалість життя не менше 12 тижнів від початку дослідження; вага тіла не менше 30 кг; придатність для першої лінії хіміотерапії на основі платини; адекватна робота органів і кісткового мозку; і негативний тест на вагітність для жінок до менопаузи. Пацієнти з метастазами в мозок мали право, якщо вони проходили безсимптомно або лікувались, а також стійкі до лікування стероїдами та протисудомними засобами принаймні за 1 місяць до включення у дослідження. Ключовими критеріями виключення були анамнез променевої терапії грудної клітки або запланована консолідаційна променева терапія грудної клітки; активні або попередні аутоімунні або запальні розлади; паранеопластичний синдром аутоімунного характеру, що вимагає системного лікування; історія активного первинного імунодефіциту; та неконтрольовані, супутні захворювання або активні інфекції. Повні критерії прийнятності містяться в додатку (стор. 6–10). Усі пацієнти надали письмову інформовану згоду на участь [124].

Всі препарати вводили внутрішньовенно. У всіх трьох досліджуваних групах хіміотерапія складалася з етопозиду 80–100 мг / м² (вводився на 1–3 дні кожного 21-денного циклу), з вибором дослідником ділянки карбоплатину під кривою 5–6 мг / мл на хвилину або цисплатин 75–80 мг / м² (вводиться 1-го дня кожного циклу). Пацієнти в групах імунотерапії отримували до чотирьох циклів платини – етопозид плюс дурвалумаб 1500 мг з тремеліумабом або без нього кожні 3 тижні з подальшою підтримкою дурвалумабу 1500 мг кожні 4 тижні. Пацієнти групи платина-етопозид можуть отримувати додаткові два цикли платини-етопозиду (загалом до

шести циклів) та профілактичне опромінення черепа після хіміотерапії на розсуд дослідника. Пацієнти продовжували лікування до прогресування захворювання за оцінкою дослідника, неприпустимою токсичністю або іншими критеріями припинення лікування, що зустрічались. Продовження досліджуваного лікування після прогресування захворювання було дозволено, якщо були дані про клінічну користь (додаток р. 4). Перехресне дослідження з платини – етопозиду на імунотерапію плюс групи платина – етопозид не дозволялося.

Візуалізацію пухлини проводили кожні 6 тижнів протягом перших 12 тижнів, а потім кожні 8 тижнів, до підтвердження об'єктивного прогресування захворювання. Виживаність оцінювали кожні 2 місяці після припинення лікування. Небажані явища оцінювались згідно загальних термінологічних критеріїв Національного інституту раку щодо несприятливих подій, версія 4.03 [124].

Результати

Основною кінцевою точкою було загальне виживання (час від рандомізації до смерті з будь-якої причини). Вторинними кінцевими точками були виживання без прогресування (час від рандомізації до дати об'єктивного прогресування захворювання або смерті з будь-якої причини за відсутності прогресування); об'єктивна відповідь (непідтверджена; частка пацієнтів з повною або частковою відповіддю хоча б на одне відвідування); загальна виживаність через 18 місяців, виживання без прогресування через 6 і 12 місяців та безпека. Виживання без прогресування та об'єктивна реакція оцінювались дослідниками згідно з RECIST, версія 1.1 [124].

Важливі відхилення протоколу, визначені як такі, що можуть суттєво вплинути на повноту, точність або надійність даних дослідження, або права, безпеку та добробут пацієнта, були зареєстровані у 19 (4%) з 537 рандомізованих пацієнтів: 11 у дурвалумаб плюс платина – етопозидна група та вісім у групі платина – етопозид. Демографічні показники та характеристики захворювання були добре збалансовані між групами

дурвалюмаб плюс платина – етопозид та платина – етопозид. Середній вік становив 63 роки, і більшість пацієнтів були чоловіками (374 [70%] з 537), діючими або колишніми курцями (500 [93%]) і мали діагноз IV стадії на момент діагностики (485 [90 %]); на початковому рівні у 55 (10%) пацієнтів були метастази в мозок або ЦНС, а у 212 (39%) - метастази в печінку. Три пацієнти в кожній групі не отримували принаймні одну дозу досліджуваного лікування. З 531 пацієнта, який отримував лікування, 416 (78%) отримували карбоплатин, а 132 (25%) - цисплатин. У групі дурвалумаб плюс платина – етопозид середня кількість отриманих доз дурвалумабу становила 7; 64 (24%) з 265 пацієнтів, які отримували лікування, отримували 12 і більше доз. У групі дурвалумаб плюс платина – етопозид 230 пацієнтів (87%) отримували запланований максимум чотири цикли платина – етопозид. У групі платина-етопозид 225 (85%) з 266 пацієнтів, які отримували лікування, отримували щонайменше чотири цикли платини-етопозид, а 151 пацієнт (57%) отримував максимум шість циклів [124].

Загальна виживаність була значно більшою у групі дурвалумаб та платина-етопозид, ніж у групи платина-етопозид, з HR 0.73. Середня загальна виживаність становила 13,0 місяців з дурвалумабом та платиною – етопозидом проти 10,3 місяців із платиною–етопозид; загальний показник виживання за 12 місяців становив 54% проти 40%; а загально визначені 18-місячні показники загальної виживаності становили 34% проти 25%.

Користь відносно загальної виживаності з дурвалумабом та платиною-етопозидом послідовно спостерігалась у попередньо визначених підгруп пацієнтів, визначених вихідними клінічними та демографічними характеристиками.

На момент зрізу даних 226 (84%) з 268 пацієнтів у групі дурвалумаб плюс група платина – етопозид та 233 (87%) з 269 пацієнтів групи платина-етопозид мали прогресування захворювання або померли. Медіана виживання без прогресування становила 5,1 місяця (95% CI 4,7–6 · 2) з дурвалумабом та платиною – етопозидом проти 5,4 місяців (4,8–6 · 2) з

платиною – етопозидом; показники виживання без прогресування через 6 місяців становили 45% (39 · 3–51 · 3) проти 46% (39 · 3–51 · 7); а 12-місячні показники виживання без прогресування становили 18% (13 · 1–22 · 5) проти 5% (2 · 4–8 · 0). Частка пацієнтів із непідтвердженою об'єктивною реакцією, оціненою дослідником, була вищою при застосуванні дурвалумабу плюс платина-етопозид, ніж при платині-етопозиді; 213 (79%) з 268 пацієнтів мали об'єктивну відповідь у групі дурвалумаб плюс платина – етопозид у порівнянні з 189 (70%) з 269 пацієнтів у групі платина – етопозид [124].

Шість (2%) пацієнтів у групі дурвалумаб плюс платина-етопозид та два (1%) пацієнти у групі платина-етопозид досягли підтвердженої повної відповіді. Медіана тривалості (підтвердженої) відповіді була однаковою для обох груп. Серед пацієнтів із підтвердженою відповіддю передбачуваний відсоток, що залишився у відповіді через 12 місяців був вищим при застосуванні дурвалумаб плюс платина – етопозид, ніж при платині – етопозид.

Небажані явища будь-якої причини та ступеня мали місце у 260 (98%) з 265 пацієнтів, які отримували дурвалумаб плюс платина – етопозид, і у 258 (97%) з 266 пацієнтів, які отримували платину – етопозид. Небажані явища 3 або 4 ступеня мали місце у 163 (62%) пацієнтів дурвалумаб плюс платина – етопозид і 166 (62%) пацієнтів у групі платина – етопозид, а небажані явища, що призвели до припинення лікування, мали місце у 25 (9%) пацієнтів у кожній групі. Найпоширенішими побічними явищами 3 або 4 ступеня були нейтропенія та анемія. Смерть внаслідок побічних явищ з будь-якої причини наступила у 13 (5%) пацієнтів у групі дурвалумаб плюс платина-етопозид та у 15 (6%) пацієнтів у групі платина-етопозид. Імунно-опосередковані побічні явища (імАЕ): повідомлялося про 52 (20%) з 265 пацієнтів, які отримували дурвалумаб плюс платина – етопозид, і у семи (3%) з 266 пацієнтів, які отримували платину – етопозид. Більшість із цих подій були 1 або 2 класу; імАЕ 3 або 4 ступеня спостерігались у 12 пацієнтів (5%) у групі дурвалумаб плюс платина – етопозид та у одного пацієнта (<1%) у групі платина –

етопозид. Смерть через імАЕ сталася у одного (<1%) пацієнта в кожній групі; причинами смерті були гепатотоксичність у групі дурвалумаб плюс платина – етопозид та пневмоніт у групі платина – етопозид. Найбільш поширеними імАЕ були гіпотиреоїдні події (траплялися у 24 [9%] пацієнтів у групі дурвалумаб плюс група платина – етопозид та у двох [1%] пацієнтів у групі платина – етопозид) та гіпертиреоїдні події (мали місце у 14 [5%] та жоден), які за ступенем тяжкості мали ступінь 1 або 2 [124].

Випробування CASPIAN досягло своєї основної кінцевої точки загальної виживаності для дурвалумаб плюс платина – етопозид проти платини – етопозид під час запланованого проміжного аналізу. Дурвалумаб та платина – етопозид продемонстрували статистично значуще та клінічно значуще покращення загальної виживаності порівняно з платиною – етопозидом, показник HR становив 0,73 (95% СІ 0,05–0,091; $p = 0,0047$) [124].

Загальна користь від виживання спостерігалась у всіх клінічно значущих підгрупах пацієнтів. Відповідно до результатів загальної виживаності, виживання без прогресування (оцінене без офіційного тестування статистичної значущості) також було на користь дурвалумабу плюс платина-етопозид, оскільки вони були не підтвердженими та підтвердженими об'єктивними реакціями.

Загальна користь від виживання була тривалою для дурвалумабу та платини – етопозид, про що свідчить хвіст кривої Каплана-Мейєра; у групі дурвалумаб та платина – етопозид більше пацієнтів було живими через 12 місяців та 18 місяців (визначена кінцева точка), ніж у групі платина – етопозид. Стійкі клінічні переваги також спостерігались для виживання без прогресування та відповіді на пухлину дурвалумабом плюс платина-етопозид. Ці клінічні переваги спостерігались у контексті клінічно значимої контрольної групи, яка дозволяла до шести циклів платина-етопозид. Крім того, в обох групах платиновий компонент платина-етопозид включав або карбоплатин, або цисплатин [124].

Наші результати, які узгоджуються з результатами недавнього дослідження IMpower13312 [115] атезоліумабу та карбоплатину – етопозиду, представляють прогрес у клінічних результатах для пацієнтів із запущеним SCLC, які отримували лікування в першій лінії. Однак існують деякі помітні відмінності в дизайні досліджень між CASPIAN та IMpower133, включаючи використання до шести циклів платина – етопозид у контрольній групі CASPIAN (до чотирьох циклів було дозволено в контрольній групі IMpower133), а також використання вибору платини дослідником (карбоплатин або цисплатин) в обох групах. Для платино-етопозидної групи CASPIAN медіана загальної виживаності узгоджувалась з попередніми повідомленнями [99,111,113,115], тоді як медіана виживання без прогресування була довшою, ніж у контрольній групі в IMpower133 [115]. Хоча графік сканування в CASPIAN був однаковим для обох груп лікування, він трохи відрізнявся від показника у IMpower133. Краще раннє виконання в контрольній групі CASPIAN може бути керуючись тим фактом, що більше половини пацієнтів групи платина-етопозид CASPIAN отримували шість циклів платина – етопозид, порівняно з максимумом чотирьма циклами у контрольній групі IMpower133 [115]. Зокрема, додавання дурвалумабу до платини –Етопозид у CASPIAN не впливав на кількість циклів, що отримували платина – етопозид, оскільки аналогічна більшість пацієнтів отримувала щонайменше чотири цикли в кожній групі (87% у групі дурвалумаб плюс група платини – етопозиду та 85% у платина–етопозидній групі). На момент розробки дослідження CASPIAN було рекомендовано від чотирьох до шести циклів платина-етопозид, оскільки жодні дані не підтверджували, що шість циклів платина-етопозид призведе до кращого результату, ніж чотири цикли. Крім того, даних щодо безпеки було недостатньо для поєднання хіміотерапії та імунотерапії в SCLC. Отже, платина-етопозид обмежувався мінімально рекомендованою кількістю циклів (тобто чотирма) в групах імунотерапії, тоді як до шести циклів платина-

етопозид дозволявся в контрольній групі для відображення поточної клінічної практики [124].

Незважаючи на те, що ефект лікування дурвалумабом та платиною – етопозидом проти платини – етопозидом був стійким протягом досліджуваного періоду, необхідні більш тривалі спостереження для встановлення довготривалої переваги виживання у пацієнтів, які реагували на препарат Дурвалумаб плюс платина – етопозид. Застосування інгібіторів PD-1 або PD-L1 [125-127] призвело до значної частки тих, хто вижив на тривалий термін серед пацієнтів з різними стадіями недрібноклітинного раку легенів; однак, ступінь переваги відносно довготривалого виживання при імунотерапії залишається продемонструвати в SCLC. Необхідне подальше дослідження з метою виявлення пацієнтів із SCLC, які можуть отримати користь відносно довготривалого виживання, включаючи аналізи біомаркерів, таких як експресія PD-L1 та мутаційне навантаження пухлини. Краще розуміння біології, що лежить в основі, є важливим для виявлення того, які пацієнти з цим гетерогенним захворюванням можуть отримати більшу користь від лікування, щоб терапія могла бути індивідуально адаптована.

У пацієнтів з запущеним SCLC метастази в мозок є характерними і пов'язані з поганими клінічними результатами. Роль профілактичного опромінення черепа (ПОЧ) у пацієнтів з запущеним SCLC після лікування платиною – етопозидом залишається суперечливою, суперечливі дані її потенціалу щодо виживання [128-130]. У CASPIAN, оскільки не було даних про безпеку щодо використання ПОЧ одночасно з блокуванням імунної контрольної точки, спрямованої на шлях PD-1 та PD-L1 на момент початку дослідження, ПОЧ було дозволено лише у платини – етопозид групі; 21 (8%) пацієнт у контрольній групі отримував ПОЧ. Потрібні подальші дослідження для визначення ролі ПОЧ при запущеному SCLC, особливо із застосуванням блокаторів імунної контрольної точки, спрямованої на шлях PD-1 та PD-L1 у поєднанні з хіміотерапією.

Загальний профіль безпеки у CASPIAN був подібним між двома групами, з однаковою частотою побічних явищ 3 або 4 ступеня, побічних явищ, що призвели до припинення лікування, та побічних явищ, що призвели до смерті. Найпоширенішими побічними явищами були гематологічні токсичні ефекти, деякі з яких були чисельно вищими у групі платина-етопозид, можливо через більшу кількість циклів платини – етопозиду, отриманих у контрольній групі, ніж у групі дурвалумаб плюс платина – етопозид. Імунно-опосередковані побічні ефекти були переважно низького рівня та керовані стандартними рекомендаціями щодо лікування, і були чисельно вищими у групі дурвалумаб та платина-етопозид, ніж в групі платина – етопозид [131].

На закінчення, це рандомізоване відкрите дослідження фази 3 продемонструвало, що додавання дурвалумабу до платини-етопозиду як першої лінії лікування запущеного SCLC призвело до значно вищого загального виживання, ніж у контрольній групі, що відображає сучасну клінічну практику [108-110]. Профіль безпеки відповідав попереднім повідомленням як про дурвалумаб, так і про платину – етопозид. Ці результати представляють важливий крок вперед у забезпеченні гнучкості поєднання імунотерапії з різними схемами на основі платини при запущеному SCLC, розширюючи можливості лікування як для пацієнтів, так і для лікарів [124].

3.1.3 Роль мутації EGFR при лікуванні недрібноклітинного раку легень

У пацієнтів із запущеним або метастатичним недрібноклітинним раком легенів (НДКРЛ) з мутаціями гена, що кодує рецептор епідермального фактора росту (EGFR), чутливими до інгібіторів тирозинкінази (ТКІ) (делеції екзону 19 або точкові мутації L858R), гайдлайни рекомендують лікування EGFR-ТКІ [133-136]. Клінічні гайдлайни NCCN рекомендують осімертиніб

як найкращий варіант EGFR-ТКІ для лікування першої лінії у таких пацієнтів [136].

Осімертиніб є незворотним пероральним EGFR-ТКІ третього покоління, який вибірково пригнічує як сенсibiliзуючі до EGFR-ТКІ мутації, так і мутації резистентності EGFR p.Thr790Met (T790M) і продемонстрував ефективність у пацієнтів з НДКРЛ, які мають метастази в центральній нервовій системі (ЦНС) [135-138]. Випробування FLAURA було подвійним сліпим випробуванням фази 3, в якому брали участь пацієнти з раніше нелікованим поширеним НДКРЛ з мутацією EGFR, в якому порівнювали ефективність та безпеку осімертинібу з ефективністю двох інших EGFR-ТКІ, гефітинібу або ерлотинібу (включаючи обидва препарати у групі порівняння) [139].

Первинний аналіз показав значно більшу виживаність без прогресування при режимі осімертинібу, ніж при режимі порівняння (медіана 18,9 місяців проти 10,2 місяців; коефіцієнт ризику прогресування захворювання або смерті 0,46; $P < 0,001$). На момент первинного аналізу дані про загальну виживаність були незрілими (зрілість даних 25%), але демонстрували тенденцію до більш тривалої загальної виживаності з осімертинібом (коефіцієнт ризику смерті 0,63; $P = 0,007$) [139]. Профіль безпеки осімертинібу був подібно до порівняльних EGFR-ТКІ, а частота серйозних побічних ефектів була нижчою для осімертинібу [139]. На підставі цих даних про ефективність та безпеку показання для осімертинібу було розширено, включивши лікування першої лінії у пацієнтів із поширеним НДКРЛ, пухлини якого мають сенсibiliзуючі мутації EGFR [140, 141]. Тут ми повідомляємо результати запланованого остаточного аналізу загальної виживаності [132].

Методи дослідження

Повна інформація щодо випробування FLAURA була опублікована раніше [139] та міститься в протоколі випробування, доступному з повним текстом цієї статті на NEJM.org. Коротко, придатні пацієнти мали вік 18

років і старше (в Японії 20 років і старше), мали місцево запущений або метастатичний НДКРЛ з мутацією EGFR (делеція екзону 19 або L858R), раніше не отримували лікування від запущеного захворювання та були придатні на лікування першої лінії гефітинібом або ерлотинібом. Пацієнти з відомими або підозрюваними метастазами ЦНС мали право брати участь, якщо їх стан був неврологічно стабільним.

У цьому подвійному сліпому дослідженні фази 3 пацієнти були стратифіковані за мутаційним статусом EGFR (делеція екзону 19 або L858R) та расою (азіатська або неазіатська) і були випадковим чином призначені у співвідношенні 1: 1 для прийому орального осимертинібу (у дозі 80 мг один раз на день) або порівняльний пероральний EGFR-ТКІ (гефітиніб у дозі 250 мг один раз на день або ерлотиніб у дозі 150 мг один раз на день) до прогресування захворювання, неприпустимої токсичності або відмови від згоди. Пацієнти в групі порівняння (комбінація тих, хто отримував або гефітиніб, або ерлотиніб) мали право на перехід на осимертиніб у відкритому режимі після того, як прогресування захворювання було об'єктивно підтверджено під час сліпого незалежного центрального огляду (або за оцінкою дослідників, якщо прогресування захворювання відбулося після первинного зрізу даних) та постпрогресивного документування наявності мутації резистентності T790M при місцевому або центральному тестуванні.

Результати

З грудня 2014 року по березень 2016 року в цілому 556 пацієнтам було проведено рандомізацію (279 - отримували осимертиніб і 277 - отримували компаратор EGFR-ТКІ) і отримували принаймні одну дозу випробуваного препарату. У групі порівняння 183 пацієнти (66%) отримували гефітиніб, а 94 пацієнти (34%) отримували ерлотиніб як призначене лікування. Раніше повідомлялося про демографічні характеристики на бейзлайн [132,139].

На момент припинення збору даних медіана впливу лікування становила 20,7 місяців (діапазон від 0,1 до 49,8) у групі осимертинібу та 11,5 місяців (діапазон від 0,0 до 50,6) у групі порівняння. Кількість пацієнтів, які

продовжували отримувати призначений пробний препарат на момент обмеження даних, становила 61 (22%) у групі осимертинібу та 13 (5%) у групі порівняння [132].

На момент припинення збору даних сталася 321 смерть (зрілість даних дослідження 58%), що представляло заплановану кількість подій та зрілість. Усі пацієнти мали можливість пройти спостереження 39 місяців; медіана тривалості спостереження за загальною виживаністю становила 35,8 місяців у групі осимертинібу та 27,0 місяців у групі порівняння. Середня загальна виживаність становила 38,6 місяців (95% довірчий інтервал [ДІ], 34,5-41,8) у групі осимертинібу та 31,8 місяців (95% ДІ, 26,6-36,0) у групі порівняння (коефіцієнт ризику смерті 0,80; 95,05% CI, 0,64-1,00; P = 0,046) (Малюнок 1). Рівень виживаності та кількість пацієнтів, які продовжували отримувати досліджуваний препарат першої лінії, були стабільно вищими в групі осимертинібу, ніж у групі порівняння, на 12, 24 та 36 місяці (рис. 3.3).

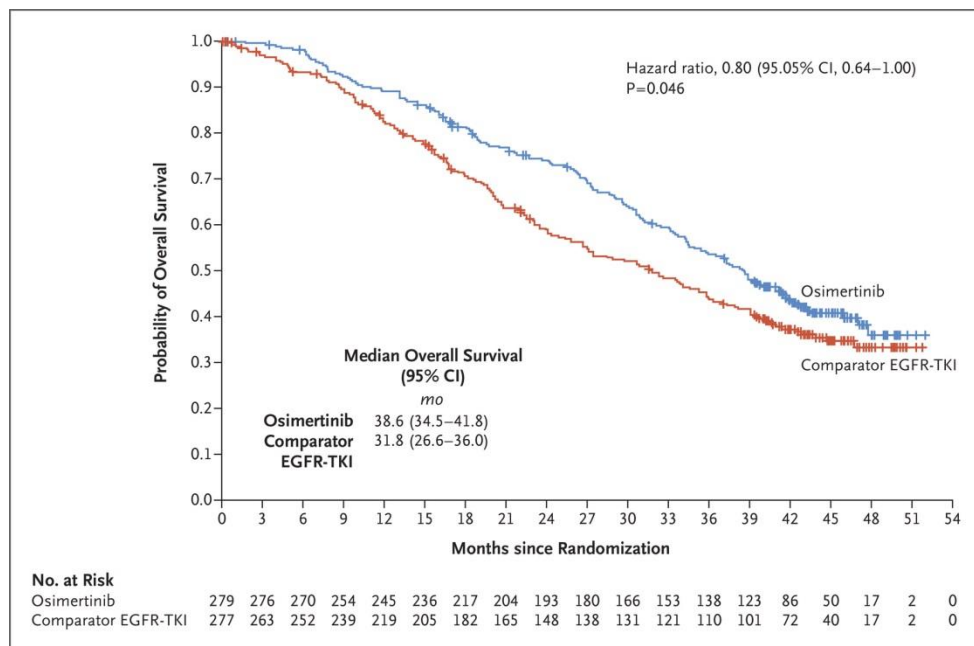


Рисунок 3.3 – Загальна виживаність пацієнтів.

Користь відносно виживаності з осимертинібом у порівнянні з порівняльним EGFR-ТКІ була постійною у заздалегідь визначених підгрупах, з різною величиною користі. Довірчі інтервали накладались на всі підгрупи та між ними. Найбільші числові різниці між групами у співвідношенні

ризикую для загальної виживаності спостерігались між азіатськими та неазіатськими пацієнтами [132].

Загалом 133 пацієнти (48%) у групі осимертинібу та 180 (65%) у групі порівняння розпочали першу подальшу протипухлинну терапію після припинення призначеного лікування. З цих пацієнтів 85 із 180 (47%) у групі порівняння отримували осимертиніб як першу подальшу терапію (рис. 3A); ці пацієнти становили 31% із 277, які були віднесені до групи порівняння. Серед усіх пацієнтів, які пройшли рандомізацію, кількість тих, хто отримував другу подальшу терапію, становила 72 з 279 (26%) у групі осимертинібу та 92 з 277 (33%) у групі порівняння. Серед пацієнтів, які отримували першу подальшу терапію, кількість тих, хто отримував другу подальшу терапію, становила 72 із 133 (54%) у групі осимертинібу та 92 із 180 (51%) у групі порівняння (рис. 3.4).

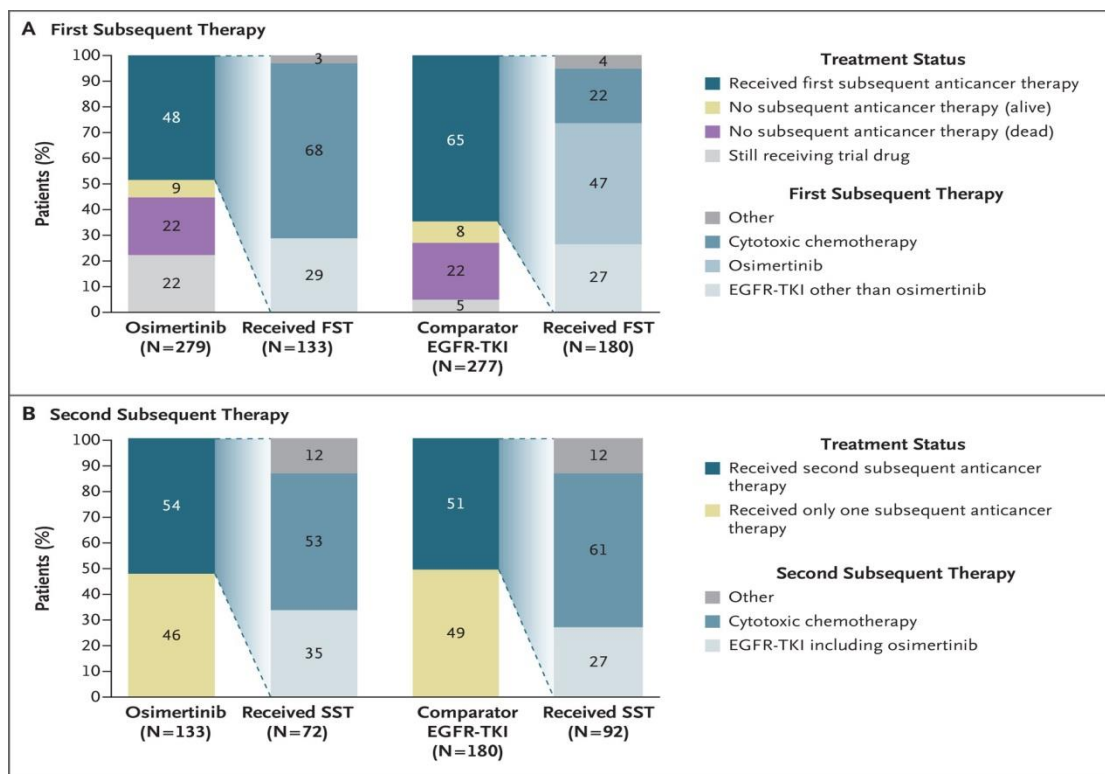


Рисунок 3.4 – Показники ефективності отриманої терапії.

При аналізі загальної виживаності профіль безпеки осимертинібу відповідав профілю безпеки в первинному аналізі. Загалом, 98% пацієнтів у двох випробуваних групах мали принаймні одну побічну подію. Небажані

явища, які, як вважали, можуть бути пов'язані із досліджуваним препаратом, перераховані в таблиці S5. Побічні явища 3 ступеня або вище були зареєстровані у 42% пацієнтів у групі осимертинібу та у 47% пацієнтів у групі порівняння.

Таблиця 3.2 – Небажані клінічні симптоми.

Table 2. Adverse Events.*								
Adverse Event	Osimeertinib (N=279)				Comparator EGFR-TKI (N=277)			
	Any Grade	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Any Grade	Grade 1	Grade 2	Grade 3
	<i>number of patients (percent)</i>							
Diarrhea	167 (60)	119 (43)	41 (15)	7 (3)	162 (58)	118 (43)	35 (13)	7 (3)
Rash or acne†	164 (59)	132 (47)	29 (10)	3 (1)	219 (79)	111 (40)	88 (32)	20 (7)
Nail effects†	108 (39)	61 (22)	45 (16)	2 (1)	95 (34)	58 (21)	35 (13)	2 (1)
Dry skin†	106 (38)	89 (32)	16 (6)	1 (<1)	102 (37)	78 (28)	21 (8)	3 (1)
Stomatitis	82 (29)	66 (24)	14 (5)	1 (<1)	60 (22)	51 (18)	8 (3)	1 (<1)
Decreased appetite	66 (24)	32 (11)	27 (10)	7 (3)	58 (21)	29 (10)	24 (9)	5 (2)
Cough	60 (22)	42 (15)	18 (6)	0	50 (18)	33 (12)	17 (6)	0
Nausea	55 (20)	37 (13)	18 (6)	0	55 (20)	31 (11)	23 (8)	0
Constipation	51 (18)	42 (15)	9 (3)	0	39 (14)	29 (10)	10 (4)	0
Pruritus	50 (18)	41 (15)	8 (3)	1 (<1)	44 (16)	33 (12)	14 (5)	0
Renal symptoms‡	50 (18)	32 (11)	13 (5)	3 (1)	32 (12)	24 (9)	7 (3)	1 (<1)
Fatigue	45 (16)	25 (9)	17 (6)	3 (1)	35 (13)	23 (8)	10 (4)	2 (1)
Anemia	44 (16)	22 (8)	15 (5)	7 (3)	27 (10)	19 (7)	5 (2)	3 (1)
Dyspnea	42 (15)	28 (10)	12 (4)	2 (1)	22 (8)	10 (4)	9 (3)	3 (1)
Vomiting	41 (15)	32 (11)	9 (3)	0	32 (12)	24 (9)	4 (1)	4 (1)
Headache	39 (14)	29 (10)	8 (3)	2 (1)	25 (9)	17 (6)	8 (3)	0
Back pain	36 (13)	22 (8)	14 (5)	0	29 (10)	15 (5)	14 (5)	0
Upper respiratory tract infection	36 (13)	20 (7)	16 (6)	0	23 (8)	12 (4)	11 (4)	0
Pyrexia	32 (11)	28 (10)	4 (1)	0	12 (4)	9 (3)	2 (1)	1 (<1)
Insomnia	31 (11)	23 (8)	8 (3)	0	21 (8)	12 (4)	9 (3)	0
Nasopharyngitis	31 (11)	17 (6)	14 (5)	0	16 (6)	11 (4)	5 (2)	0
Prolonged QT interval	28 (10)	12 (4)	12 (4)	4 (1)	12 (4)	7 (3)	3 (1)	2 (1)
Increase in aspartate aminotransferase	28 (10)	19 (7)	7 (3)	2 (1)	69 (25)	39 (14)	18 (6)	12 (4)
Musculoskeletal pain	28 (10)	19 (7)	9 (3)	0	14 (5)	8 (3)	6 (2)	0
Alopecia	22 (8)	18 (6)	4 (1)	0	35 (13)	31 (11)	4 (1)	0
Increase in alanine aminotransferase	19 (7)	11 (4)	6 (2)	2 (1)	74 (27)	30 (11)	19 (7)	21 (8)

Серйозні побічні явища були зареєстровані у 27% пацієнтів у кожній дослідній групі. Повідомлялося про зменшення фракції викиду у 13 пацієнтів (5%) у групі осимертинібу та у 5 (2%) у групі порівняння, про відсутність

пов'язаних симптомів. Подовження інтервалу QT на електрокардіографії повідомлялося у 28 пацієнтів (10%) у групі осимертинібу та у 12 пацієнтів (4%) у групі порівняння. Не було нових повідомлень про інтерстиціальне захворювання легенів, про яке повідомлялося у 6 пацієнтів (2%) у групі осимертинібу та у 4 (1%) у групі порівняння, або про пневмоніт, про який повідомлялося у 5 (2%) та 2 (1%) відповідно (табл. 3.2).

Про летальні побічні явища повідомляли у 9 пацієнтів (3%) у групі осимертинібу та у 10 (4%) у групі порівняння. Жодна із смертей у групі осимертинібу та 2 у групі порівняння не була визнана такими, що пов'язані з лікуванням.

У групі осимертинібу переривання дози мали місце у 120 пацієнтів (43%), зменшення дози у 14 (5%) та постійне припинення лікування через несприятливі явища у 41 (15%); у групі порівняння відповідні цифри становили 113 (41%), 10 (4%) та 50 (18%).

У дослідженні FLAURA, подвійному сліпому, рандомізованому дослідженні фази 3, у якому брали участь неліковані пацієнти з поширеним EGFR-позитивним НМРЛ, ті, хто отримував осимертиніб, мали значно довше виживання без прогресування, що призвело до значно більшої загальної виживаності, ніж ті, хто отримував для порівняння EGFR-ТКІ (або гефітиніб, або ерлотиніб) (коефіцієнт ризику для прогресування захворювання або смерті, 0,46 [$P < 0,001$]; коефіцієнт ризику для смерті, 0,80 [$P = 0,046$]) [139]. З можливістю проведення щонайменше 39 місяців спостереження у двох групах середня загальна виживаність була більшою на 6,8 місяців у групі осимертинібу, ніж у групі порівняння, з 20% меншим ризиком смерті навіть за наявності переходу з групи порівняння на групу осимертинібу. Крім того, через 36 місяців утричі більше пацієнтів продовжували отримувати призначений пробний препарат у групі осимертинібу, ніж у групі порівняння. Жодних нових сигналів безпеки не спостерігалось, а побічні явища 3 або вище ступеня та частота припинення

лікування через побічні явища були однаковими у двох групах, незважаючи на більшу тривалість впливу осимертинібу [132].

Користь відносно загальної виживаності для осимертинібу спостерігалась у більшості заздалегідь визначених підгруп. Величина користі варіювалась, і коефіцієнт небезпеки становив близько 1,00 як для азіатських, так і для мутаційних підгруп L858R EGFR. Крива Каплана – Мейєра щодо виживаності серед азіатських пацієнтів показала ранню перевагу для осимертинібу, яка зберігалася приблизно до 3 років спостереження. В якості вторинної кінцевої точки дослідження та аналіз азіатської підгрупи пацієнтів не були забезпечені для загального аналізу виживання.

Осимертиніб є більш ефективним у попередньо пролікованих пацієнтів, у яких розвивається мутація резистентності до EGFR T790M, ніж інші EGFR-ТКІ попереднього покоління [142-144]. Отже, перехід від порівняльної групи до групи осимертинібу, ймовірно, сприяв тривалості загальної виживаності у групі порівняння (31,8 місяця). Попередні клінічні випробування першого та другого поколінь EGFR-ТКІ показали результати середньої загальної виживаності в межах приблизно від 18 до 28 місяців [145-149]. Нещодавно дослідження ARCHER 105020 [150] продемонструвало середню загальну виживаність 26,8 місяців для гефітинібу та 34,1 місяців для дакомітинібу. Однак, на відміну від дослідження FLAURA, дослідження ARCHER 1050 виключало пацієнтів з метастазами в ЦНС, ускладненням, пов'язаним з коротшим виживанням.

У дослідженні FLAURA пацієнти з підтвердженням про T790M-позитивну мутацію після прогресування захворювання мали право на перехід з групи порівняння для отримання осимертинібу в якості лікування другої лінії. Після прогресування захворювання мутація резистентності до EGFR T790M розвивається приблизно у 50% пацієнтів, які отримують EGFR-ТКІ попереднього покоління [151, 152], створюючи, таким чином, біологічно обмежену кількість пацієнтів, які мають право отримувати осимертиніб як терапію другої лінії. В реальних умовах повідомляється, що від 25 до 39%

пацієнтів, які отримують EGFR-ТКІ першого або другого покоління, продовжують отримувати осимертиніб як терапію другої лінії відповідно до рівня кросинговеру 31% (у 85 з 277 пацієнтів), що спостерігався у всіх пацієнтів, яких було віднесено до групи порівняння у FLAURA (тобто, 85 із 180 пацієнтів [47%], які припинили прийом препарату для порівняння EGFR-ТКІ та отримували осимертиніб як першу подальшу терапію) [153-155].

Подальша терапія, отримана в кожній дослідній групі, відповідала очікуванням на основі рекомендацій щодо лікування цієї групи пацієнтів. Більшість пацієнтів групи осимертинібу отримували хіміотерапію як першу подальшу терапію, тоді як перехід на осимертиніб був найбільш поширеною першою подальшою терапією в групі порівняння. Частка пацієнтів, які отримували інший режим, що містить EGFR-ТКІ (крім осимертинібу), була однаковою в обох групах. Подібна частка пацієнтів отримувала другу подальшу терапію в двох групах, і типи терапії, були подібними.

У двох групах приблизно 30% пацієнтів припинили випробуваний препарат і не отримували першої подальшої терапії через смерть приблизно у 70% цих пацієнтів. Цей відсоток узгоджується з результатами попередніх досліджень із залученням пацієнтів з мутацією EGFR, які отримували терапію EGFR-ТКІ [153-155]. Це спостереження стало основою для використання найбільш ефективних методів у першій лінії лікування для пацієнтів із запущеною стадією раку.

Серед пацієнтів з НМРЛ, які мають мутації EGFR, метастази в ЦНС виявляються приблизно у 25% пацієнтів на момент постановки діагнозу і розвиваються приблизно у 50% усіх пацієнтів протягом 3 років після встановлення діагнозу [156]. Як ми повідомляли в первинному аналізі даних дослідження FLAURA, осимертиніб також мав активність у пацієнтів з метастазами в ЦНС [138]. Вживання без прогресування через 18 місяців серед пацієнтів з метастазами в ЦНС становило 58% (95% ДІ, від 40 до 72) у групі осимертинібу та 40% (95% ДІ, від 25 до 55) у групі порівняння

(коефіцієнт ризику для прогресування захворювання або смерті, 0,48; 95% ДІ, 0,26 до 0,86).

Розуміння механізмів резистентності після лікування першої лінії та визначення відповідної терапії на основі профілів молекулярної стійкості залишаються важливими міркуваннями. Попередні дані свідчать про те, що механізми резистентності до осимертинібу в якості терапії першої лінії подібні до тих, що спостерігаються у пацієнтів з мутацією T790M, які отримують осимертиніб як терапію другої лінії; такі механізми стійкості також подібні до механізмів, пов'язаних з менш частими мутаціями (тобто, крім T790M), які спостерігаються у пацієнтів, які мають резистентність до інших EGFR-ТКІ першого та другого покоління [157]. Подальші дослідження тривають у фазі 2 ELIOS випробування. Дослідження для розуміння найбільш ефективного лікування на основі моделей резистентності після прогресування захворювання, поки пацієнти отримують терапію осимертинібом першої лінії, також триває в двох дослідженнях фази 2: дослідження ORCHARD [132].

Таким чином, ми виявили, що лікування першої лінії осимертинібом асоціювалось із значно довшою загальною виживаністю, ніж лікування порівнюваними EGFR-ТКІ у пацієнтів з місцево-поширеним або метастатичним НДКРЛ та позитивною мутацією EGFR, і мало подібний профіль безпеки [132].

Результати за даним напрямком роботи опубліковані виконавцями науково-дослідної роботи у наступних працях:

Mok TSK, Wu YL, Kudaba I, Kowalski DM, Cho BC, Turna HZ, Castro G Jr, Srimuninnimit V, Laktionov KK, Bondarenko I, Vynnychenko I. et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for previously untreated, PD-L1-expressing, locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-042): a randomised, open-label, controlled, phase 3 trial. Lancet. 2019 May 4;393(10183):1819-30. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)32409-7.

Jotte R, Cappuzzo F, Vynnychenko I, Stroyakovskiy D, Rodríguez-Abreu D, Hussein M, Soo R, Conter HJ, Kozuki T, Huang KC, Graupner V, Sun SW, Hoang T, Jessop H, McClelland M, Ballinger M, Sandler A, Socinski MA. Atezolizumab in Combination With Carboplatin and Nab-Paclitaxel in Advanced Squamous NSCLC (IMpower131): Results From a Randomized Phase III Trial. *J Thorac Oncol.* 2020 Aug;15(8):1351-60. DOI: 10.1016/j.jtho.2020.03.028.

Ramalingam SS, Vansteenkiste J, Planchard D, ... Vynnychenko I ... Overall Survival with Osimertinib in Untreated, EGFR-Mutated Advanced NSCLC. *N Engl J Med.* 2020 Jan 2;382(1):41-50. DOI: 10.1056/NEJMoa1913662.

Paz-Ares L, Dvorkin M, Chen Y, et al. Durvalumab plus platinum-etoposide versus platinum-etoposide in first-line treatment of extensive-stage small-cell lung cancer (CASPIAN): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet.* 2019;394(10212):1929-1939. doi:10.1016/S0140-6736(19)32222-6

Винниченко І.О., Москаленко Ю.В., Тарасенко С.В., Винниченко О.І., Пустовгар Л.Г., Смородська О.М., Сердюк М.Ю. Аналіз поширеності раку легенів серед жінок сумської області. *J.Clin.Exp. Med. Res.*, 2017;5(3):881–90.

Винниченко І.О., Привалова А.О., Смородська О.М., Винниченко О.І., Москаленко Ю.В. Рідинна біопсія: перспективи застосування в онкології (огляд літератури). *Art of Medicine.* 2018;1(5):85-91.

Винниченко І.О., Москаленко Ю.В., Сердюк М.Ю., Винниченко О.І. Особливості диференціальної діагностики доброякісних пухлин легень та її значення для вибору хірургічної тактики. *Клінічна хірургія.* 2018;85(4): 67–70.

Винниченко ІО, Москаленко ЮВ, Винниченко ОІ, Москаленко РА, Піддубний АМ. Бульозний пемфігоїд Левера у хворого на метастатичний рак легені після лікування атезолізумабом. *Клінічна онкологія.* 2019;9(1):1–3. DOI 10.32471/clinicaloncology.2663-466X.38.22146.

Москаленко ЮВ, Винниченко ІО, Смородська ОМ, Винниченко ОІ, Москаленко РА. PD-L1 тестування як спосіб персоналізації лікування недрібноклітинного раку легень. *Лікарська справа.* 2019;4:40-45. DOI 10.31640/JVD.5-6.2019(4).

3.2 Дослідження морфологічних та імуногістохімічних особливостей раку молочної залози

На сьогодні описано 26 типів інвазивних форм РМЗ, серед яких у 50-80% випадках у біопсійному та післяопераційному матеріалі виявляється інвазивний рак неспецифічного типу (ІРНТ). Цей тип карцином молочної залози позбавлений достатньої кількості специфічних ознак для однозначного встановлення діагнозу ІРНТ, іноді потребуючи додаткових імуногістохімічних досліджень для встановлення остаточного діагнозу [155].

При морфологічному дослідженні матеріалу при ІРНТ молочної залози сапостерігається вузлове ураження МЗ. У більшості випадків відсутні чіткі контури пухлини. Вони мають, в основному, щільну консистенцію, різко відрізняючись від навколишньої тканини, з якою новоутворення міцно пов'язані. Поверхня зрізу має сірий колір, іноді наявні крововиливи, кальцифікати, які визначалися візуально або за характерним звуком під час проведення розрізу, та вогнища некрозу жовтого кольору. Розміри зони ураження коливаються від 1,3см до 12,0см у діаметрі. Контури ракового вузла у більшості випадків нерівні та у вигляді тяжів, які проникають у тканину МЗ з формуванням зірчастої конфігурації. Статистично-достовірної різниці у локалізації цього виду пухлини, порівнюючи з іншими гістологічними варіантами, не виявлено – майже однакова їх кількість виявлена лівій та правій МЗ. Інколи спостерігається двобічне ураження залоз. Більша кількість випадків виявляється на І-ІІ стадіях захворювання зі зростанням цього показника упродовж останніх років. Досить часто метастатичне ураження лімфатичних вузлів не залежить від розміру первинного вогнища, що вказує на незалежність віддаленого поширення пухлини від місцевого розростання новоутворення у МЗ.

При гістологічному дослідженні у тканині ІРНТ виявлено наявність гнізд, трабекул та кластерів, які представлені пухлинними клітинами [155]. Частина випадків характеризується солідним ростом із різним ступенем

розвитку стромы. Неопластичні клітини мають різний ступінь прояву атипізму. Цитоплазма частіше добре виражена та еозинофільна. Ядра округлі, мономорфні або з вираженим поліморфізмом, добре помітні ядерця. Мітотична активність клітин виражена порізно – від повної відсутності до більш ніж 20 мітозів в одному полі зору. В оточуючих ділянках іноді наявні вогнища протокової карциноми *in situ*. У неопластичній тканині виявляються ділянки крововиливів, некрозів, петрифікації та гіалінозу. При дедиференціюванні пухлин зростає частка пухлинної тканини з солідним або трабекулярним характером росту клітин, які іноді розташовуються відокремлено та у вигляді ланцюжків.

Морфологічні особливості будови пухлинної тканини та рівень проліферативної активності та атипізму клітин дозволяє розділити всі випадки IPHT за ступенем диференціювання. Для пухлин низького ступеню злякисності (low-grade) притаманним є наявність тубуло-залосистих структурна більше ніж 75% площі препарату (рис. 3.5). Переважна кількість клітин має правильну (циліндричну або кубічну) форму, дрібні мономорфні ядра. Клітини вистилають пухлинні утворення в один ряд – відсутній базальний шар клітин. Інколи виявляється різний ступінь прояву ядерного і клітинного поліморфізму. Мітотична активність знаходиться на доволі низькому рівні та не перевищує 15 мітозів у 10 полях зору при збільшенні мікроскопу $\times 400$. Ключовим моментом є наявність у стромі окремих пухлинних комплексів, що є індикатором інвазивного характеру росту неоплазії. Вторинні зміни є нехарактерними для low-grade IPHT [15].

Пухлини з високим злякисним потенціалом (high-grade) характеризуються зменшенням площі, представленої тубулярними структурами, до повного її зникнення (рис. 3.5). Неопластичні клітини проявляють різний ступінь клітинного та ядерного атипізму зі зростанням їх проліферативного потенціалу, який перевищує 15 мітозів у 10 полях зору. Для цього ступеню диференціювання пухлин притаманним є як скірозний варіант тип росту за умови переважання та гіалінозу стромы та окремо

розсіяними або у вигляді ланцюжків неопластичними клітинами, так і майже тотального розростання ракових клітин при незначному стромальному компоненті. У препаратах іноді наявні виродливі та багатоядерні клітини з вираженим гіперхроматозом ядер. Ракові клітини іноді мають лімфоцитоподібні форму та розміри з майже непомітною цитоплазмою. В основному неопластична тканина складається з досить великих клітин з доволі вираженою еозинофільною цитоплазмою та гіперхромними ядрами і одним або кількома ядерцями. Клітини майже завжди зберігають здатність до адгезії між собою. У неопластичній тканині часто візуалізуються петрифікати, некрози, крововиливи та запальна інфільтрація.

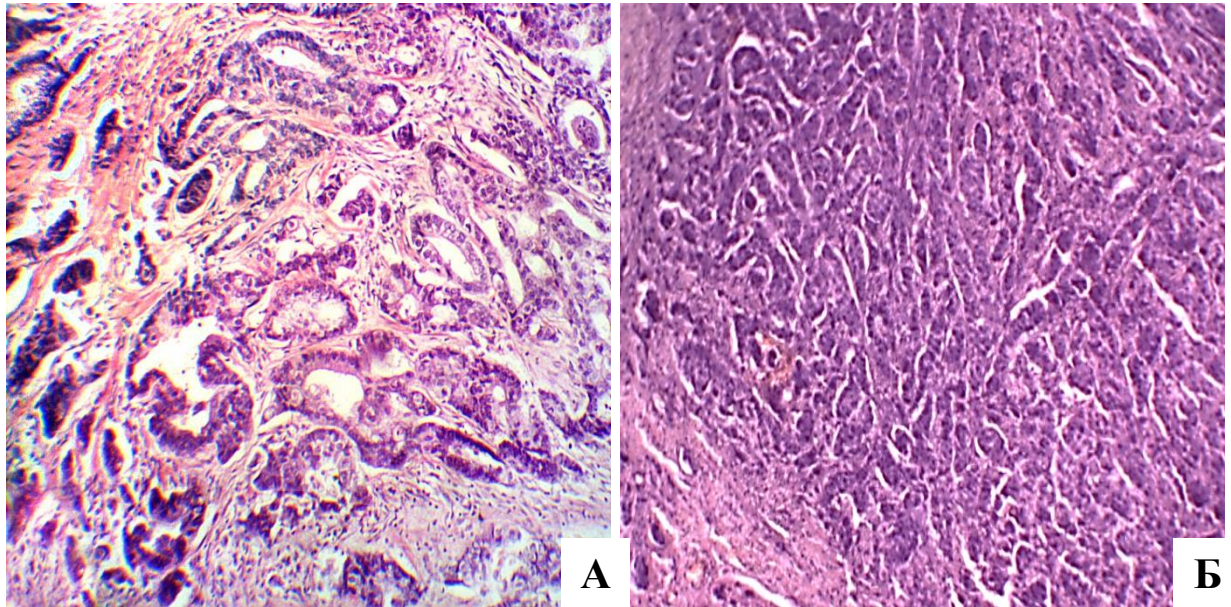


Рисунок 3.5 – ІДРТ різного ступеню диференціювання: А – low-grade, Б – high-grade.

Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення $\times 100$.

Слід зазначити, що low-grade ІДРТ молочної залози зустрічаються значно рідше (близько 20%), ніж high-grade карциноми. При дедиференціюванні новоутворень відбувається зростання метастатичного потенціалу новоутвореної тканини та підвищення її проліферативна активність. Останні більш яскраво виражена у периферичних ділянках пухлини, порівняно з прицентральною зоною. Залучення до неопластичного

процесу шкіри та віддалене поширення пухлини в інші органи спотрагається виключно у низько диференційованих пухлинах [155].

Явища патологічної кальцифікації (петрифікації), яка спостерігається у близько 35% випадків, виявлено в усіх складових компонентах неопластичної тканини ІРНТ (паренхімі та стромі). Вони представлені вогнищевим згрупованим відкладанням солей кальцію та дифузно-розташованими розрізненими петрифікатами різної форми та розмірів (рис. 3.6). Додаткове дослідження препаратів при їх забарвленні алізариновим червоним S дозволило візуалізувати не тільки кальцій-позитивний сигнал у складі петрифікатів, але і в їх навколишніх ділянках та в цитоплазмі неопластичних клітин. Щодо перифокальної реакції навколо кальцифікатів, то вона має різний ступінь прояву зі зменшенням інтенсивності сигналу у більш віддалених ділянках. Це слугує індикатором прогресуючого характеру відкладання кальцій-вмісних солей у неопластичній тканині та послідуєчим ущільненням структури петрифікатів.

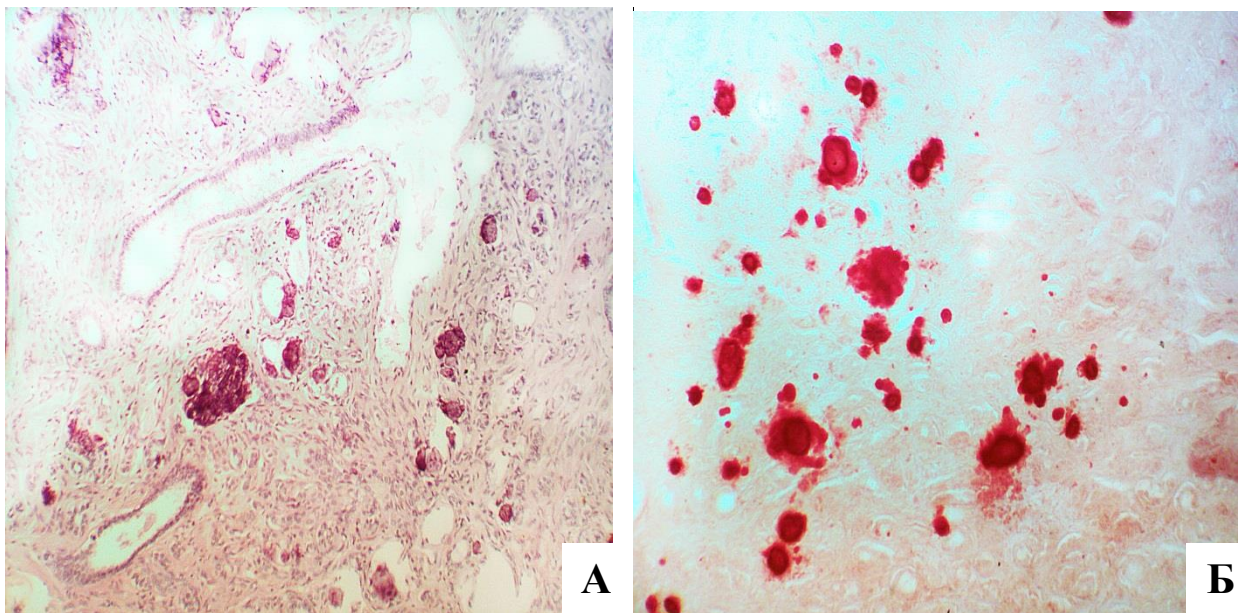


Рисунок 3.6 – Петрифікація тканини ІРНТ.

Забарвлення гематоксиліном та еозином (А) та алізариновим червоним S (Б). Збільшення $\times 100$.

Наявність імунної реакції у тканині ІРНТ спостерігається приблизно у 45% випадків. Вона представлена лімфоцитами, гістіоцитами (макрофагами), сегментоядерними лейкоцитами та поодинокими плазмацитами. Вони можуть розташовуватись як розрізнено, так і утворюючи трабекуло- та нодулоподібні скупчення. Іноді рівень цієї реакції настільки виражений, що у неопластичній тканині виявляються фолікулоподібні утворення з центрами розмноження або відмічається майже повне заміщення стромального компоненту імунітетами. Довготривалість процесу інколи супроводжується гранулематозною реакцією, у складі якої виявляються багатоядерні клітини за типом клітин «сторонніх тіл». Це є індикатором толерантності імунної відповіді на персистуючий провокуючий фактор (пухлину).

Посилення інтенсивності імунної відповіді, а також тенденції до петрифікації, спостерігається при прогресуванні неопластичного процесу та зростанні злоякісності пухлин. Більш яскраво це відбувається за умови набуття раковими клітинами вираженого поліморфізму. Відмічається поєднання патологічної мінералізації в тканині молочної залози та запальною інфільтрацією.

Ступінь ангиогенезу неопластичної тканини також залежить від ступеню диференціювання пухлин. Для більш злоякісних карцином притаманне переважання капілярного типу васкуляризації зі значно меншою кількістю більш товстостінних судин (венул та артеріол).

При проведенні імуногістохімічного дослідження встановлено, що тканина ІРНТ у 78% випадків має ядерну експресію ER (клон SP1). Керуючись рекомендаціями D.C.Allred, виявлено, що серед них слабопозитивна реакція спостерігається у 31% випадків, помірнопозитивна – у 23% та сильно-позитивна – у 46% випадків (рис. 3.6). Щодо ПР (клон YR85), то встановлено, що ракова тканина експресує ці рецептори у 62% випадків. Серед них слабо-позитивна реакція виявлена у 43% випадків, помірнопозитивна реакція у 31% та сильнопозитивна реакція – у 26% випадків. Більшість випадків РМЗ характеризується гетерогенною експресією

рецепторів, коли у пухлинній тканині присутні як рецептор-негативні, так рецептор-позитивні неопластичні клітини з різною інтенсивністю експресії ER та PR (рис. 3.7) [155].

Спостерігається сильний позитивний кореляційний зв'язок між експресією ER та PR. Дедиференціювання IPHT та наявність запальної інфільтрації у пухлинному мікрооточенні супроводжуються зниженням чутливості ракових клітин до статевих гормонів.

Експресію HER2/neu (клон SP3) у неопластичній тканині виявлено у 20% випадків, яка проявлялася інтенсивним суцільним забарвленням мембрани пухлинних клітин (рис. 3.6). Наявність HER2/neu спостерігалась значно частіше у high-grade пухлинах із стероїд-негативним імуногістохімічним профілем. Подібно експресії ER та PR, при дослідженні HER2/neu виявляються випадки з гетерогенною реакцією, що є індикатором мінливості рецепторного фенотипу неопластичних клітин при прогресуванні злякисного процесу [155].

Імуногістохімічні особливості метастатичної тканини у лімфатичних вузлах у більшості випадків співпадають із рецепторним профілем пухлинних клітин у первинному вогнищі – лише іноді спостерігається пригнічення сигналу ER та PR у метастазах.

Індекс проліферації, оцінений за допомогою дослідження ядерної експресії Ki-67 (клон SP6), у тканині IPHT характеризується вираженою гетерогенністю. Проліферативний потенціал неопластичної тканини у переважній більшості випадків перевищував інтенсивність поділу клітин у відносно-нормальній навколишній тканині молочної залози. Натомість, кількість Ki-67-позитивних клітин була більшою у метастатичних вогнищах по відношенню до першоджерела. Так, слабкопозитивна реакція ($1\% < n < 14\%$) виявлена у 40% випадків, помірнопозитивна ($14\% < n < 30\%$) – у 37% та сильнопозитивна ($30\% < n < 100\%$) – у 23% випадків (рис. 3.7). Серед неопластичної тканини зустрічалися як «гарячі» імуногістохімічні ділянки з вираженою експресією Ki-67 у переважній більшості клітин, так і «холодні»

вогнища при майже повній відсутності поділу у ракових клітинах. Більш вищі показники індексу проліферації виявляються у тканині ІРНТ з відсутньою та слабкою експресією ЕР та ПР [155].

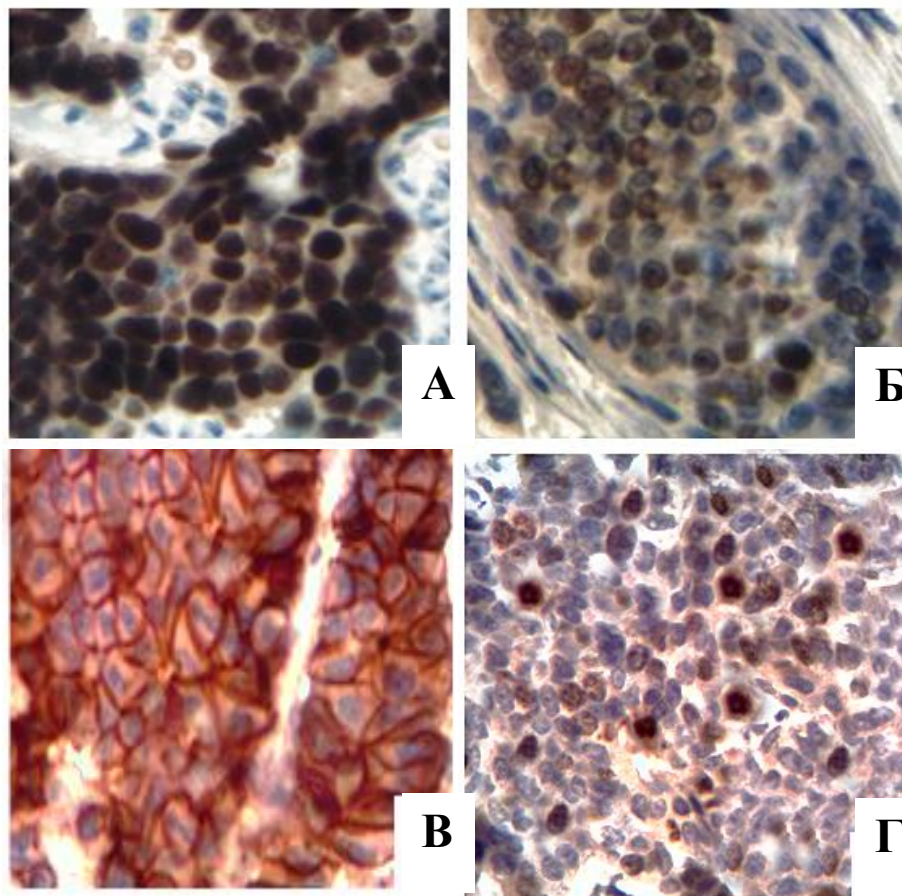


Рисунок 3.7 – ІРНТ. ІГХ дослідження експресії ЕР (А), ПР (Б), HER2/neu (В) та Ki-67 (Г). Збільшення $\times 400$.

Дослідження експресії білків p53 (SP5) та bcl-2 (100/D5) дозволяє визначити проапоптичний та антиапоптичний потенціал пухлинних клітин ІРНТ молочної залози. Серед усіх випадків позитивна експресія (інтенсивне забарвлення ядер більше 5% клітин) p53 виявлена у 40% випадків. Серед них слабопозитивна реакція ($5\% < n < 20\%$) визначається 32% випадків, помірнопозитивна – ($20\% < n < 50\%$) – у 47% та сильнопозитивна ($50\% < n < 100\%$) – у 21% випадків (рис. 3.7). Метастатична тканина характеризується значно вищими показниками експресії p53. Зростання експресії p53 спостерігається при дедиференціюванні новоутворень та

набутті раковими клітинами вираженого поліморфізму, а також при зростанні проліферативної активності ракових клітин [155].

Експресія раковими клітинами bcl-2 у цитоплазмі є індикатором антиапоптозного їх потенціалу. Позитивну реакцію виявлено у 56% випадків (рис. 3.8). Наявність цих білків супроводжується рецептор-позитивним профілем клітин до EP, оскільки ген Bcl-2 є естроген залежним, транскрипція якого відбувається при надходженні сигналів від EP. Спостерігається позитивний кореляційний зв'язок між експресіями bcl-2 та p53, що вказує на взаємозв'язок між цими двома регуляторами апоптозу.

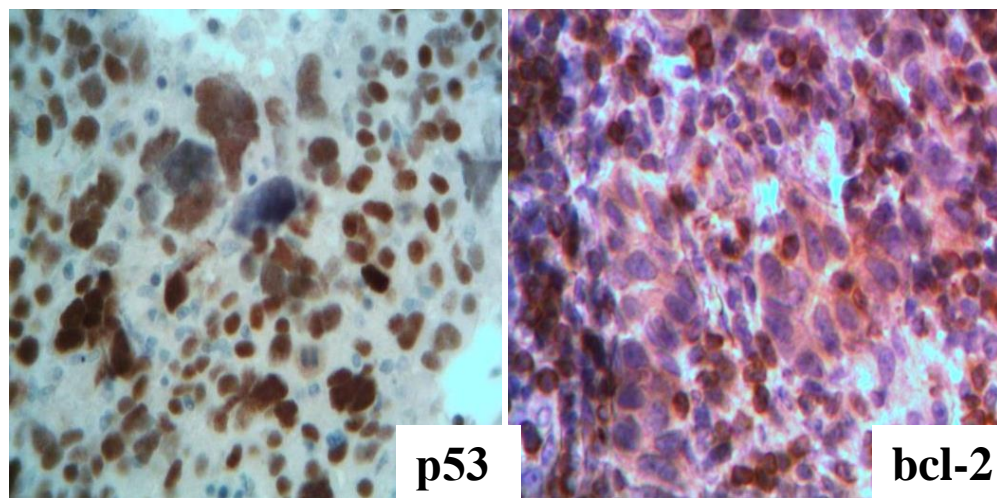


Рисунок 3.8 – ІРНТ.

ІГХ дослідження експресії p53 та bcl-2. Збільшення $\times 400$.

Експресія ММП1 (поліклон) є індикатором інвазивного потенціалу пухлин. Ці білки, проявляючи колагеназну активність, беруть участь у розрідженні стромы та поширенні неопластичних клітин в оточуючі ділянки та судини. Тканина ІРНТ характеризується позитивною цитоплазматичною експресією ММП1 у ракових клітинах у 57,5% (рис. 3.9). Слід зазначити, що деякі клітини стромы також мають позитивну експресію цих білків. Більш виражене накопичення ММП1 спостерігається у периферичних ділянках неопластичної тканини, що вказує на безпосередню їх участь у розповсюдженні пухлин. При контакті ракових клітин зі стромою за рахунок

розчинення останньої виникають лакуни, в які і проникають неопластичні клітини.

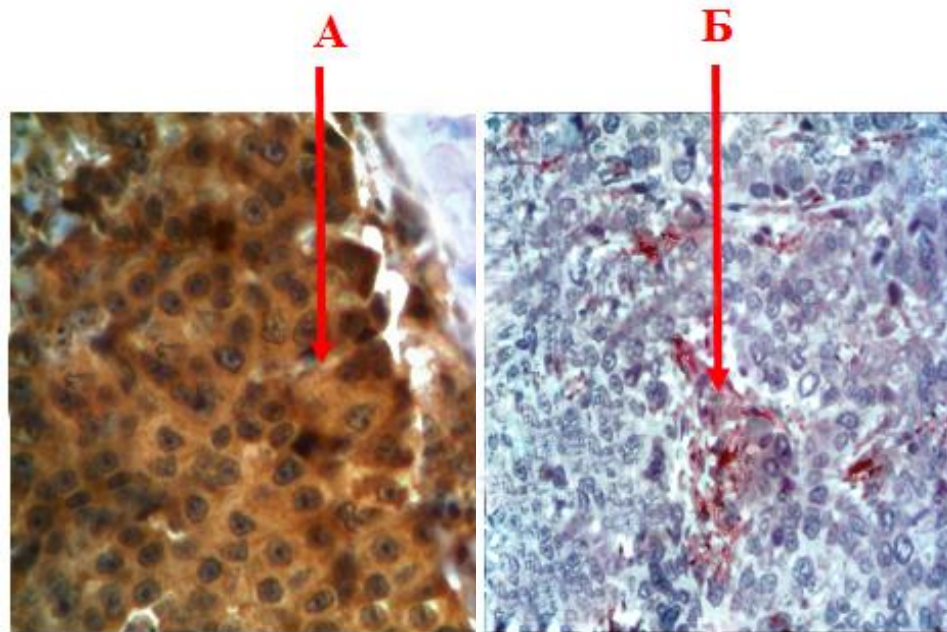


Рисунок 3.9 – ІРНТ.

ІГХ дослідження експресії MMP1. А – клітини пухлини, Б – клітини строми.

Збільшення $\times 400$.

Усі 100% пухлин є Е-кадгерин-позитивними (клон 67A4). Більш того цей маркер є індикатором ІРНТ молочної залози, який дозволяє віддиференціювати цей тип карциноми від інших злоякісних епітеліальних пухлин у молочній залозі. Щодо ступеню експресії, то слабкопозитивна реакція спостерігається 37,5% випадків, помірнопозитивна – у 37,5% та сильнопозитивна – у 25% випадків (рис. 3.10). Установлена протилежно спрямована залежність між експресіями MMP1 та Е-кадгерину, а також зростання метастатичного потенціалу клітин при пригніченні експресії адгезивних білків [155].

При імуногістохімічному дослідженні встановлено, що експресія ЕСФР (поліклон) у цитоплазмі неопластичних клітин наявна у 70%, серед яких слабкопозитивна реакція спостерігається у 43%, помірнопозитивна – у 47% та сильно-позитивна – у 10% випадків (рис. 3.11).

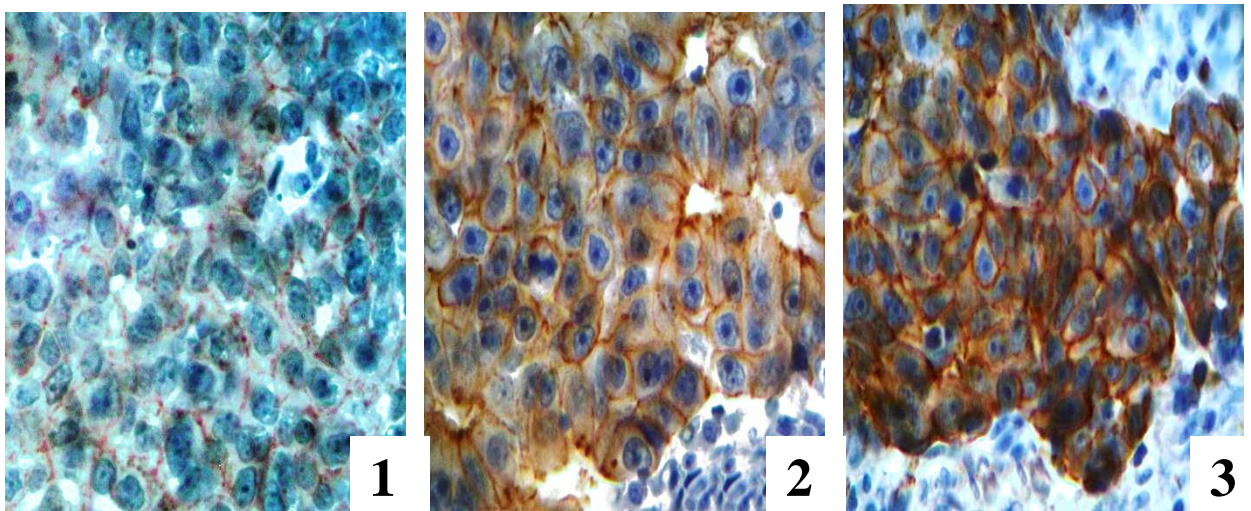


Рисунок 3.10 – ІРНТ.

ІГХ дослідження експресії Е-кадгерину.

1 –слабопозитивна, 2 – помірнопозитивна та 3 – сильнопозитивна мембранна реакція. Збільшення $\times 400$.

Позитивна реакція спостерігається також у клітинах строми пухлини та ендотелії судин, підкреслюючи їх участь у ангіогенезі пухлин.

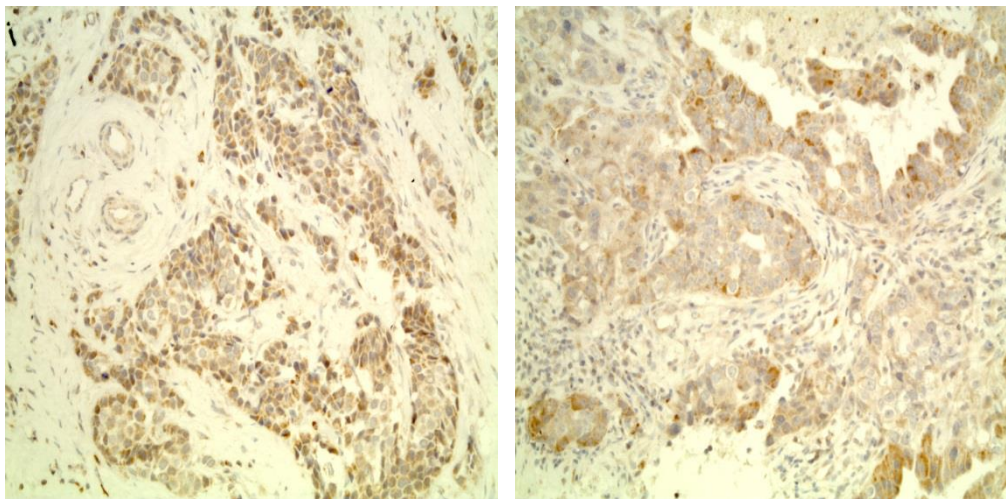


Рисунок 3.11 – ІРНТ.

ІГХ дослідження рецепторів ЕСФР. Збільшення $\times 400$.

Посилення рівня експресії ЕСФР при дедиференціюванні новоутворень МЗ супроводжується зростанням васкуляризації пухлини та віддаленим метастазуванням карцином.

Експресія остеопонтину (поліклон) спостерігається лише у тканині ІРНТ з петрифікацією. Серед усіх випадків пухлинної тканини з біомінералізацією наявність остеопонтину у неопластичних клітинах виявляється у 55% випадків. У переважній більшості наявна слабо- та помірно-позитивна реакція, і лише іноді (близько 10%) – сильнопозитивна реакція (рис. 3.12). Зростання рівня злоякісності пухлин супроводжується посиленням експресії остеопонтину[155].

Експресія шаперону 90α (поліклон) у пухлинних клітинах виявлено у цитоплазмі та ядері у різних співвідношеннях. Позитивну реакцію різної інтенсивності виявлено у майже 80% випадків ІРНТ (рис. 3.12). Рівень експресії цього білка посилюється при зростанні інфільтрації пухлин імуноцитами. Усі HER2/neu-позитивні новоутворення супроводжуються наявністю шаперону 90α. Установлено негативний кореляційний зв'язок між експресією рецепторів ЕР та ПР і шаперонами, що вказує на участь цих білків у блокуванні гормонально-залежного фенотипу ракових клітин.

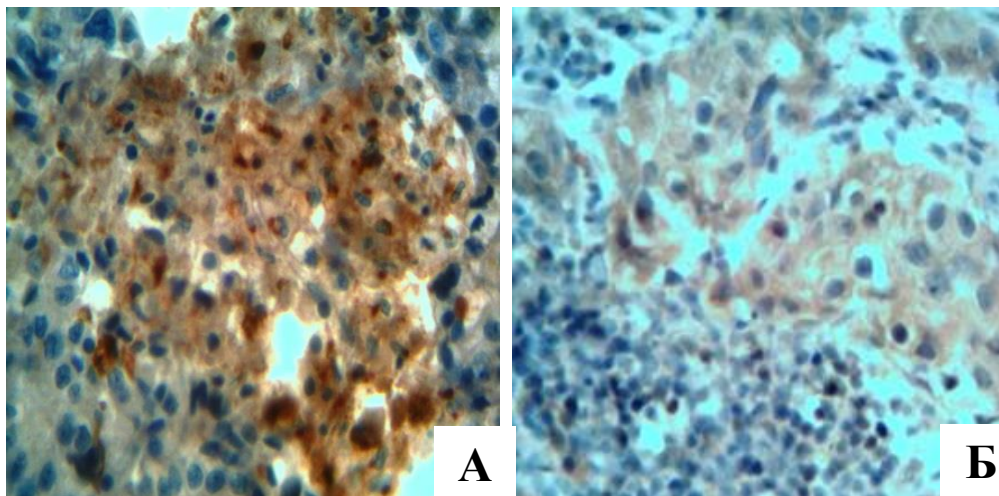


Рисунок 3.12 – ІРНТ.

ІГХ дослідження рецепторів остеопонтину (А) та шаперону 90 (Б).

Збільшення $\times 400$.

Дослідження якісного складу пухлинного імунного мікрооточення показало, що В-лімфоцити у ньому (експресія CD79α, клон SP18) складають від 20% до 60% (рис. 3.13), а Т-лімфоцити (експресія CD3, клон SP7) від 25%

до 70% (рис. 3.12). Взагалі на частку лімфоцитів припадає 85-90% серед усіх форм лейкоцитів мікрооточення. Гранулоцити (експресія мілопероксидази, поліклон) у навколопухлинному просторі займають лише від 1% до 7% (рис. 3.13), тоді як на долю макрофагів (експресія S100, клон 4C4.9) припадає не більше як 15% від всіх форм лейкоцитів (рис. 3.13).

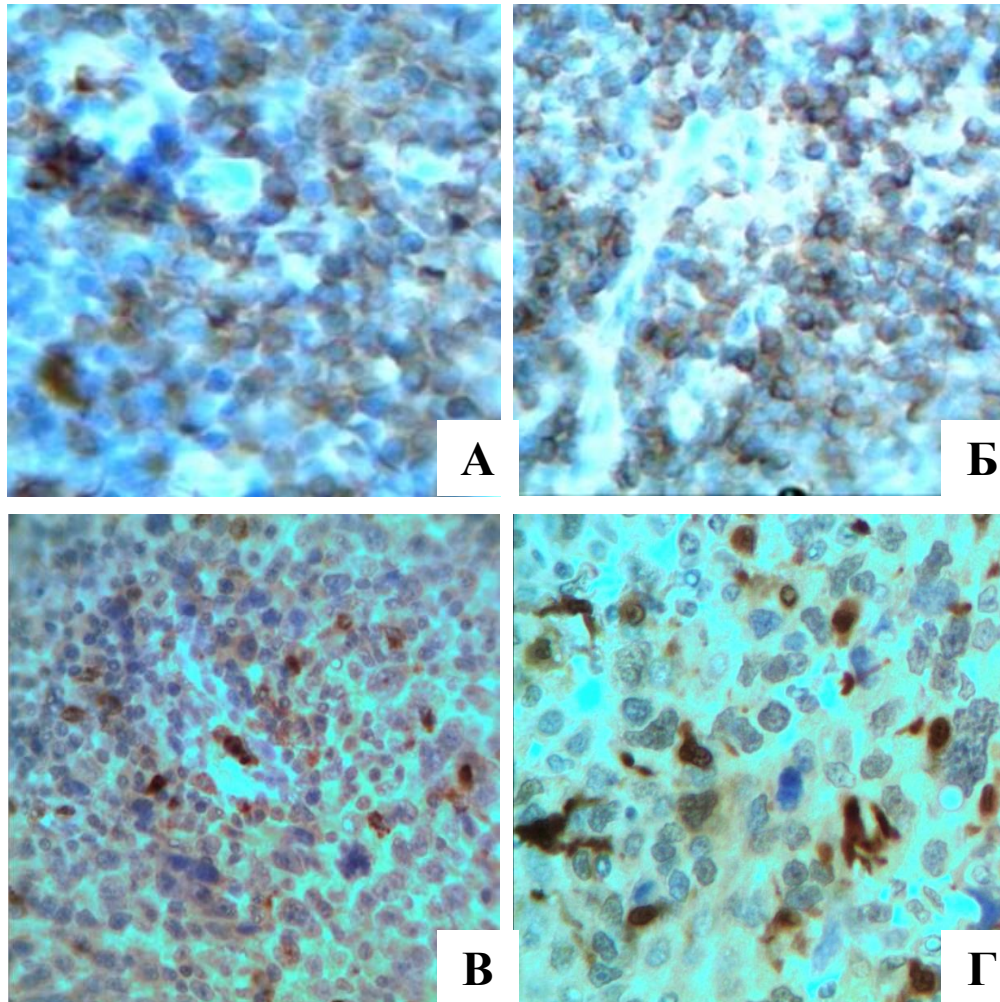


Рисунок 3.13 – ІРНТ.

Імунний інфільтрат у стромі ІРНТ.

ІГХ дослідження рецепторів CD79 α (А), CD3 (Б), мілопероксидази (В) та S100 (Г). Збільшення $\times 400$.

S100-позитивні клітини мають відростки, якими огортають пухлинні клітини. Вони розташовувались розрізнено як серед імуноцитів, так і серед неопластичних клітин. При накопиченні В-лімфоцитів відбувається зменшується рівня експресії ЕР та ПР. Отже, якісні характеристики ракової

тканини залежать не тільки від самого факту наявності запалення навколо пухлинних клітин, а в більшій мірі від якісного складу імунного інфільтрату.

Тканина ІРНТ характеризується варіабельною васкуляризацією, яку встановлено за допомогою імуногістохімічного дослідження рецепторів CD31 (клон 1A10). Для low-grade пухлин притаманна наявністю різнокаліберних судин з невисокою мікросудинною щільністю непластичної тканин. Низькодиференційовані пухлини мають значно менший відсоток «зрілих» судин та більшу мікросудинну щільність (рис. 3.14). Спостерігається зростання щільності капілярів при надекспресії VEGF. Слід зазначити, що всі CD31-позитивні структури, виявлені в карциномах, розцінюються або як повноцінні судини (капіляри), або їх попередники (навіть при відсутності в них просвітів). У пухлинній тканині виявлені ділянки як з вираженою мікросудинною щільністю, так і гіповаскуляризовані вогнища [155].

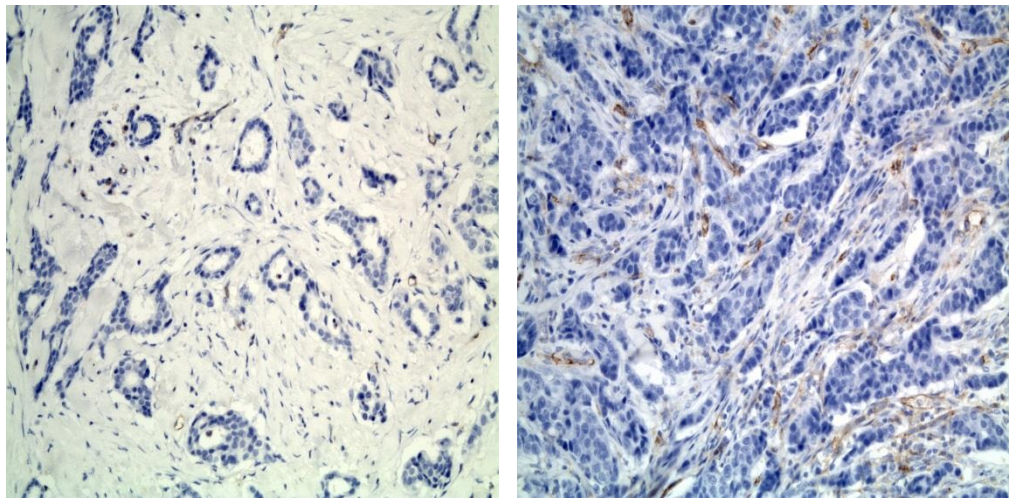


Рисунок 3.14 – ІРНТ.

ІГХ дослідження рецепторів CD31. Збільшення $\times 400$.

3.2.1 Дослідження РІКЗСА-мутантної циркулюючої пухлинної ДНК у пацієнтів з раком молочної залози

Широке впровадження малоінвазивного і високочутливого методу «liquid biopsy» може допомогти подолати діагностичні труднощі за рахунок

отримання інформації про склад та наборі мутацій в неопластической тканини шляхом дослідження позаклітинної циркулюючої пухлинної ДНК (цпДНК) в різних біологічних рідинах [38,158]. Клінічне застосування виявлення цпДНК методом «liquid biopsy» широко досліджується в останні роки [159,160]. ЦпДНК, яка несе в собі специфічні для пухлини генетичні зміни, виділяється неопластичними клітинами в кровотік і являє собою лише невелику частку позаклітинної ДНК [38,159,161,162]. Фракція цпДНК серед позаклітинної ДНК варіюється в широких межах від 0,01% до 90% в залежності від пухлинної навантаження. Існуючі до недавнього часу обмеження її виявлення, включаючи короткий період напіврозпаду, нівелюються з розвитком сучасних молекулярних методів дослідження. Виходячи з цього, вивчення цпДНК стало багатообіцяючим інструментом для діагностики злоякісних захворювань. Так, цифрова полімеразна ланцюгова реакція (цПЦР) широко використовується в якості одного з найбільш точних методів для виявлення цпДНК в крові завдяки її високій чутливості [162,163].

За даними Всесвітньої Організації Охорони Здоров'я (ВООЗ), рак грудної залози (РГЗ) входить до топової трійки найпоширеніших онкологічних захворювань у світі (поряд з раком легень та колоректальним раком), та посідає п'яте місце за рівнем смертності (627 000 смертей, 6,6%). Рак грудної залози є одним з провідних захворювань за кількістю нових випадків. У 2018 році було встановлено майже 2,1 мільйона діагнозів, що складає 11,6% від загальної онкологічної захворюваності. Це найчастіша онкологічна патологія, яка діагностується у жінок (24,2%, тобто приблизно кожен четвертий з усіх нових випадків раку, діагностованих у жінок у всьому світі, є раком грудної залози). Рак грудної залози також є провідною причиною смерті від раку у жінок у всьому світі (15,0%) [164]. Згідно з даними Національного канцер-реєстру України у 2017р. було зафіксовано 14514 нових випадків раку грудної залози, зокрема 14402 випадки серед жінок та 112 серед чоловіків. В структурі онкологічної захворюваності та

смертності серед жіночого населення України РГЗ займає перше місце (20,1%). Так, показник захворюваності у 2017р. склав 40,3 на 100 тис. населення, в той час як показник смертності становив 15,8 на 100 тис. Найчастіше хворіють жінки репродуктивного віку (30-54 років). З настанням менопаузи спостерігається поступове зниження показника захворюваності. Ще рідше РГЗ спостерігається у жінок віком 18-29 років та вкрай рідко у дитячому віці. Показник летальності впродовж першого року захворювання – 9,6%. Смертність від раку грудної залози займає лідируючі позиції у структурі смертності від злоякісних пухлин серед жінок старших 30 років. Найвищий показник захворюваності спостерігається у Кропивницькій, Київській, Запорізькій, Харківській та Херсонській областях, в той час як найменше на рак грудної залози хворіють жителі Рівненської, Івано-Франківської, Закарпатської, Тернопільської та Чернівецької областей. На кінець 2017 року в Україні було зафіксовано 147192 пацієнти, які перебувають на обліку з приводу раку грудної залози [165].

Найчастіше дана патологія діагностується на пізніх стадіях, що і визначає високий рівень смертності від неї. Найбільшу небезпеку становить метастатичний РГЗ, який вкрай важко піддається лікуванню, незважаючи на застосування комбінованих схем, що включають хіміо- і гормонотерапію, а також використання таргетних протипухлинних препаратів. У зв'язку з цим представляється актуальною розробка підходів для більш ефективного скринінгу РГЗ і вибору засобів для таргетної терапії з урахуванням молекулярно-генетичних особливостей пухлини [166].

Ген PIK3CA (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha) є одним з онкогенів [167], соматичні мутації в якому відіграють значну роль у патогенезі та прогресії злоякісних пухлин, зокрема у хворих на рак грудної залози (8,3-40%) [168-171]. З моменту відкриття мутацій гена PIK3CA у солідних злоякісних пухлинах у 2004 році, численні дослідження виявили прогностичні та терапевтичні наслідки цих мутацій [170,171]. Твердження про залежність пухлинного раку грудної залози від PI3K

(phosphatidylinositol-3'-kinase) сигнального шляху засновано на тому, що більшість випадків цього захворювання містять принаймні один молекулярний механізм, який потенційно активує цей сигнальний шлях. Такі P13K-активуєчі механізми включають мутації гена PIK3CA. Ці мутації мають потенціал, щоб стати клінічно важливими біомаркерами, оскільки вони змінюють функції молекул, розташованих на важливому P13K сигнальному шляху, виявляються з високою частотою та легко вимірюються [171].

Характеристика P13K

Фосфатидилінозитол-3'-кінази (P13Ks) є добре вивченою родиною ліпідкіназ, які були ідентифіковані за їх здатністю фосфорилувати 3-гідроксигрупу фосфоліпідів інозитола [172]. На сьогоднішній день ферменти із P13-кіназною активністю класифікують у три класи, представники яких різняться за первинною структурою, механізмами регуляції та типом ліпідних субстратів [173]. Клас I P13K поділяється на підкласи IA та IB. Найбільше значення у розвитку раку має підклас IA P13K [171, 174].

PIK3CA кодує p110- α – каталітичну субодиницю P13K- α , яка активує сигнальні каскади, задіяні у проліферації клітин [175]. P13K- α належить до IA класу і є гетеродимерним білком, що складається із каталітичної (p110) та регуляторної адаптерної субодиниці (p85) [173]. І каталітичні, і регуляторні субодиниці гена людини P13K були клоновані Volinia et al (1994), і загальна послідовність виявилася високо гомологічною до бичачих і дріжджових генів P13K [176]. У людини p110- α експресується в усіх типах тканин [171,174], найбільша кількість – в серці, печінці, кістковому мозку, кістковій тканині, поперечно-смугастій м'язовій тканині та лімфоцитах [177].

Біологічна роль P13K-залежних сигнальних шляхів

Протеїн-тирозинкінази (protein tyrosine kinases, PTK) є важливими регуляторами внутрішньоклітинного шляху передачі сигналу [178-180]. В свою чергу, P13K є одним з регуляторних білків, що знаходяться на перетині різних сигнальних шляхів і контролюють ключові функції клітини [181].

Активация PI3K приводит до генерации вторичного мессенджера, фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфата (phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate, PIP3) з фосфатидилинозитола-4,5-бісфосфату (phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate, PIP2) (основна реакція, яку каталізує PI3K). Активация PI3K за допомогою рецептору тирозинкінази (receptor tyrosine kinase, RTK), зв'язаного з фактором росту, та подальша продукція PIP3 впливають на нижчележачі сигнальні шляхи, які регулюють ряд клітинних функцій, включаючи ті, які беруть участь у розвитку та прогресії пухлини [182]. Так, PI3K- α здійснює регуляцію функцій потенціального онкогена серин/треонінової протеїнкінази Akt (протеїнкіназа B). PI3K/Akt каскад бере участь у регуляції білкового синтезу і забезпеченні клітини енергією, тобто готує клітину до мітозу [183]. За великої кількості онкологічних розладів виявлено мутовані форми протеїнкінази Akt, причому найчастіше подібні мутації конститутивно активують PI3K- α і можуть запустити онкогенну трансформацію та хронічну активацію ефекторних сигнальних шляхів, зокрема молекул, причетних до процесів метастазування, розвитку множинної лікарської резистентності, ангиогенезу та клітинного росту. Тому PI3K- α можна розглядати як одну із потенційних мішеней при пошуку шляхів терапії онкологічних розладів [173].

З найбільшою частотою мутації PIK3CA присутні у пацієнтів з ER (estrogen receptor, естрогеновий рецептор)-позитивним та HER2 (human epidermal growth factor receptor 2, рецептор 2 епідермального фактора росту)-позитивним раком грудної залози [183, 184]. Сигналізація за участю ядерного естрогенового рецептора також передбачає активацію PI3K. У цілому дія естрогену опосередкована сукупністю як прямо контрольованої експресії генів, так і регуляцією сигнальних каскадів фосфорилування клітини. Позаядерна сигналізація ER залучає PI3K і може відігравати центральну роль у контролі клітинної проліферації та виживанні. Негеномні ефекти естрогену на PI3K шлях можуть бути спричинені безпосередньою взаємодією ER із PI3K у процесі, який включає зв'язування p85-регуляторної субодиниці з ER і

наступну ER-залежну активацію ПкВ/Акт. Альтернативний ER-опосередкований механізм активації PI3K залежить від ER-індукованої стимуляції рецепторної тирозинової протеїнкінази ErbB2, що надалі запускає активацію PI3K [173].

Мутації гена PIK3CA

Ген PIK3CA складається з 20 екзонів, що кодують 1068 амінокислот [185]. Цитогенетичною локалізацією прийнято вважати область 3q26.32 [177]. Більше 80% мутацій гена згруповані в спіральному домені, кодованому екзоном 9, і кіназному домені, кодованому екзоном 20 [184].

Загальнодоступна база даних COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) включає 20784 зразки пухлин грудної залози, в яких досліджувались мутації гена PIK3CA. Останні було виявлено в 3951 пухлині, що становить частоту мутацій 19% [186]. Несинонімічні одонуклеотидні заміни складають 98% соматичних мутацій, знайдених в гені PIK3CA. З них найбільш часто зустрічаються p.E542K c.1624G>A, p.E545K c.1633G>A, p.H1047R c.3140A>G і p.H1047L c.3140A>T [168]. Вони становлять 80-90% всіх мутацій PIK3CA в злоякісних пухлинах людини [187]. Показано, що ці мутації підвищують кіназну активність PI3K, ведуть до активації нижчележачої кінази Akt і, таким чином, є онкогенними [168]. Найбільш поширеною амінокислотною мутацією PI3K є заміна гістидину на аргінін: H1047R [167].

Роль мутацій PIK3CA у розвитку РГЗ

Із швидким розвитком технології секвенування геному, молекулярна характеристика, заснована на геномній альтерації, широко сприймається як важливе джерело стратифікації раку. Тому особливо важливо забезпечити точну терапію та зрозуміти неоднорідність пухлини на основі молекулярного типування геномних змін. Частота мутації PIK3CA підтверджує значимість PI3K в біології раку грудної залози. Припускається, що соматичні мутації PIK3CA надають багатогранну перевагу росту раковим клітинам, включаючи стійкість до антиестрогенної терапії, стимуляцію ангиогенезу та підвищену

інвазивність [187], а клінічні прояви мутацій можуть відрізнятися залежно від статусу добре відомих молекулярних маркерів при РГЗ (ERα (estrogen receptor alpha), PGR (progesterone receptor) та HER2) [188-191].

Декількома групами дослідників було виявлено, що мутації PIK3CA у хворих на РГЗ асоціюються ER-альфа-, PGR-позитивними та ERBB2-негативними пухлинами, а також з низьким гістопатологічним ступенем. Відмічалось, що мутація PIK3CA була пов'язана зі значно довшою виживаністю без метастазів у загальній популяції, особливо у пацієнтів з PGR-позитивними та ERBB2-позитивними пухлинами. Про сильний зв'язок мутацій PIK3CA з ER-позитивними випадками РГЗ за відсутності гіперекспресії HER2 повідомлялось і в іншому дослідженні, але зв'язку між загальною виживаністю та мутаційним статусом PIK3CA не було виявлено. Припускається, що PIK3CA може представляти собою молекулярну подію, що характеризує люмінальний тип раку. Цей висновок також підтверджується рідкісною наявністю мутації PIK3CA у спорадичних потрійно негативних випадках РГЗ (ER- / PGR- / HER2-) (190,191). Китайські вчені у своєму нещодавньому дослідженні також виявили позитивний кореляційний зв'язок між мутаціями PIK3CA з ER-позитивними, PGR-позитивними пухлинами та низьким індексом Ki67. Між тим, відмічалась негативна кореляція із потрійно негативним підтипом раку молочної залози. Зв'язок з віком, стадією пухлинного процесу, ступенем ураження лімфатичних вузлів, розміром пухлини або статусом HER2 був відсутній. Надалі досліджувався взаємозв'язок між клініко-патологічними ознаками та розподілом мутацій PIK3CA, включаючи мутації екзону 9/20 та мутації гарячих точок (p.542/545 та p.1047). Достовірна кореляція простежувалась між ER та PGR-позитивними пухлинами та мутаціями в екзоні 9 та в p.542/545. Крім того, низький індекс Ki67 був виявлений у пацієнтів із мутаціями екзону 20 та p.1047. Тим часом, у пацієнтів із потрійно-негативним раком грудної залози було значно менше p.1047 мутацій [192]. Інше дослідження зв'язку мутацій PIK3CA з клініко-морфологічними

характеристиками РГЗ продемонструвало збільшення частоти мутацій генів РІК3СА по мірі прогресування захворювання та тенденцію до її зростання в пухлинах з несприятливими прогностичними характеристиками (високий ступінь злоякісності, потрійний негативний фенотип). Наявність досліджуваних мутацій генів РІК3СА у пухлинах статистично значимо знижувала виживаність без рецидивів як у загальній групі, так і при III стадії захворювання. Також було виявлено, що мутаційний статус РІК3СА може змінюватися під час рецидиву захворювання або прогресування раку молочної залози; та найголовніше, наявність мутацій РІК3СА може бути пов'язана з гіршою виживаністю у пацієнтів з клінічно підтвердженими метастазами. У цьому контексті оцінка мутаційного статусу РІК3СА є стратегією з потенційним клінічним застосуванням [193].

Дані численних досліджень, що вивчали зв'язок між наявністю мутацій гена РІК3СА з прогностичними та клінічними особливостями раку грудної залози, включаючи гістологічний підтип, експресію рецепторів естрогену та прогестерону, статус рецептора Her2/неу, ступінь та/або стадія онкологічного процесу [163,169,190,191], досить суперечливі, що можна пояснити різноманітністю методів, які застосовуються для виявлення мутацій, популяційними особливостями пацієнтів і часто недостатніми розмірами вибірок. Вкрай важливо, щоб вплив мутацій гена РІК3СА на патофізіологію пухлини і її відповідь на терапію були більш ретельно проаналізовані на різних стадіях прогресії пухлини [168], адже РІК3СА може бути корисним як для діагностичних, так і терапевтичних цілей [163,194].

Мета дослідження - визначення частоти виникнення мутації в гені РІК3СА (H1047R) у пацієнтів з місцево-поширеним раком молочної залози (РМЗ) за допомогою цПЛР; дослідження порівнянності виявлення даної мутації в архівних зразках пухлинної тканини (FFPE-блоки) і цоДНК плазми крові; вивчення діагностичної і прогностичної цінності РІК3СА мутантної цпДНК у пацієнтів в якості маркера моніторингу ефективності проведеного лікування.

На дане дослідження було включено 29 пацієнтів з гістологічно верифікованим раком молочної залози, які отримували лікування на базі хіміотерапевтичного та хірургічного відділень Сумського обласного клінічного онкологічного диспансеру в 2019-2020 рр. Всім пацієнтам було виконано повне обстеження, яке включало стандартне клініко-лабораторне та рентгенологічне дослідження, комп'ютерну томографію органів грудної, черевної порожнини і головного мозку. Лікування призначалося відповідно до стандартних клінічних протоколів. Всі пацієнти підписали інформовану добровільну згоду на додаткове дослідження біопсійного матеріалу та взяття зразків крові для проведення подальшого ПЛР-дослідження.

Кожен пацієнт був ознайомлений з правилами підготовки до забору крові для ПЛР-дослідження. Забір крові виконувався з 08.00 до 12.00 ранку, після 15-ти хвилинного відпочинку пацієнта, натщесерце, з ліктьової вени одноразовою голкою діаметром 0,8-1,1 мм в стерильну вакуумну пробірку Vacutainer з розчином ЕДТА або цитратом натрію, яку кілька разів плавно перевертали для змішування крові з антикоагулянтом. Після цього пробірка Центрифуговані при кімнатній температурі протягом 20 хвилин при 3000 об / хв. Плазму переносили в стерильні пробірки об'ємом 1,5 мл по 1 мл в кожен і маркували. Всі зразки зберігалися при температурі -20°C .

Взяття зразків крові проводилося за наступним графіком: кожні 2 циклу неoad'ювантної хіміотерапії, до і після проведення оперативного втручання, перед початком і протягом проведення ад'ювантної хіміотерапії (кожні 2 циклу), після завершення лікування протягом періоду спостереження (кожні 3 місяці). Після оперативного лікування забір крові проводився через 24 години, на 5 і 10 добу, що пов'язано з періодом напіврозпаду циркулюючої пухлинної ДНК і вважається оптимальним терміном.

Для оцінки морфологічних особливостей пухлинних процесів в молочній залозі, ми проводили гістологічне та імуногістохімічне дослідження матеріалу. Дистанційна тканину містилася в 10% розчин

нейтрального формаліну на 24 години, зневоднюється в ксилол і спиртах (96-70%) в зростаючих концентраціях і полягала в парафін. З парафінових блоків робили тонкі зрізи (4 мкм) з використанням роторного мікротома Shandon Finnesse 325 (Thermo Fisher Scientific, USA), поміщали їх на скла (Thermo Fisher Scientific, USA) і висушували протягом 12 годин в термостаті. Потім, проводили процедуру депарафінізації і регідратації в ксилол і в тих, які сходять концентраціях етанолу. Частина препаратів була пофарбована методом гематоксиліном і еозином (зabarвлення гематоксиліном, міжетапні промивання у воді, диференціювання структур в 1% соляній кислоті, інкубація еозином, видалення води в спиртах в зростаючих концентраціях (70-96%) і ксилоле, експозиція в карбол-ксилолі з фінальним покриттям забарвлених зрізів тканин покривними стеклами за допомогою канадського бальзаму (Thermo Fisher Scientific, USA).

Інша частина препаратів досліджувалася за допомогою імуногістохімічного дослідження. Матеріал проходив депарафінацію і зневоднення в ксилолі і спиртах в понижуючих концентраціях (96-70%); термічну демаскування антигенів в водяній бані «СБ-4» (970С) в цитратному буфері рН 6,0 (Thermo Fisher Scientific, USA); візуалізацію реакції антиген-антитіло з використанням системи детекції «UltraVision Quanto Detection System HRP DAB Chromogen» (Thermo Fisher Scientific, USA), яка включала блокування ендогенної пероксидази перекисом водню (3% H₂O₂), блокування неспецифічного фонового сигналу «Ultra V block», посилення реакції «Primary Antibody Amplifier Quanto», фінальну візуалізацію діамінобензидіном (DAB); доокраску ядер гематоксиліном Майєра (Thermo Fisher Scientific, USA) і покриття зрізів покривними стеклами за допомогою канадського бальзаму (Thermo Scientific, USA).

Реакцію антиген-антитіло вивчали за допомогою наступних імуногістохімічних маркерів («Thermo scientific», США): для визначення експресії рецепторів естрогену (ER) і прогестерону (PR) - моноклональні кролячі антитіла клон SP1 і YR85, відповідно. Оцінку експресії ER і PR

проводили згідно рекомендацій D.C.Allred з урахуванням відсотка забарвлених ядер і інтенсивності їх забарвлення; для визначення онкопротеїнов HER2 / не використовували моноклональні кролячі антитіла (клон SP3), оцінку яких проводили з урахуванням повноти і інтенсивності забарвлення мембрани пухлинних клітин.

Для визначення соматичної мутації гена PIK3CA (H1047R) на етапі скринінгу використовували зрізи пухлинної тканини, фіксованої в формаліні і залитої в парафін. Потім, для пацієнтів з виявленою мутацією в тканинному зразку, виконували визначення мутації гена PIK3CA в цоДНК з плазми крові пацієнтів.

Для виділення ДНК використовували пухлинну тканину з парафінових блоків, очищену від надлишку парафіну, вагою до 25 мг для кожного зразка. ДНК з FFPE-блоків виділяли за допомогою набору «Quick-DNA FFPE Kit» (Zymo Research, USA) відповідно до протоколу виробника. Для постановки реакції елюїровать ДНК використовувалася негайно або зберігалася при $t \leq -20^{\circ}\text{C}$ для майбутнього використання.

ДНК з плазми крові виділяли за допомогою набору реагентів «MagMAX Cell-Free Total Nucleic Acid Isolation Kit» (Applied Biosystems, USA) відповідно до протоколу, наданим виробником.

Концентрацію виділеної ДНК оцінювали за допомогою флуориметра Qubit 4 Fluorometer і наборів реагентів «Qubit 1X dsDNA HS Assay Kit», «Qubit dsDNA BR Assay Kit» (Invitrogen, USA).

Цифрову ПЛР проводили з використанням системи цифрового ПЛР QuantStudio 3D Digital PCR System (Applied Biosystems, USA), яка включає в себе все необхідне для проведення процедури цифрової ПЛР - від завантаження досліджуваного зразка в чіп до аналізу отриманих результатів, а саме: ампліфікатор з термоблоком для чіпів ProFlex 2x Flat PCR System, прилад для читання чіпів QuantStudio 3D Digital PCR Instrument, завантажувач чіпів QuantStudio 3D Digital PCR Chip Loader. Чіп QuantStudio 3D Digital PCR 20K складається з окремих 20000 лунок, де кожна лунка являє

собою камеру для індивідуальної реакції ПЛР. Зразки геномної ДНК (гДНК) розбавляються до граничної кількості так, що більшість індивідуальних ПЛР-реакцій містять або нуль, або одну молекулу ДНК [25-26]. Соматичну мутацію гена *PIK3CA*, представлену «hotspot» варіантом в екзоні 20 кіназного домену (p.H1047R), шукали за допомогою TaqMan dPCR Liquid Biopsy Assay (Applied Biosystems, USA). Після змішування розведеного зразка гДНК з попередньо змішаним праймерами, зондами (міченими барвниками FAM і VIC, Applied Biosystems) і ПЛР майстер-міксом, реакційна суміш завантажується на чіп, який, в свою чергу, міститься в ПЛР-машину для запуску реакції [25]. Протокол термоциклирования виглядає наступним чином: 10 хвилин при 96 ° С, 39 циклів при 60 ° С по 2 хвилини, 98 ° С протягом 30 секунд і 60 ° С протягом 1 хвилини. Цифрова ПЛР є аналіз кінцевої точки, заснований на використанні 5'-екзонуклеазної активності полімерази і флуорогенних зондів TaqMan, націлених на мутацію. Абсолютна кількісна оцінка мішені розраховується за статистикою Пуассона, заснованої на кількості негативних осередків, які не містять ДНК [25-26]. Після постановки реакції чіп поміщається в QuantStudio 3D Instrument для зчитування флуорогенних сигналів. Дані аналізуються з використанням програмного забезпечення QuantStudio 3D AnalysisSuite. Результати оцінюються в копіях / мкл послідовностей нуклеїнових кислот, мічених барвниками VIC або FAM [25].

Результати

У 17% пацієнтів (5/29 випадків) виявлено мутацію гена *PIK3CA* в пухлинній тканині, яка також була виявлена в цпДНК плазми крові. Для дослідження чутливості і специфічності методу цПЦР, зразки плазми крові від 5 пацієнтів з РМЗ без мутації *PIK3CA* також були протестовані на *PIK3CA*-мутовані цпДНК. Ні в одному з цих зразків не було виявлено *PIK3CA*-мутантних цпДНК.

Результати кількісного визначення мутації РІКЗСА з використанням чіпа QuantStudio 3D Digital PCR 20K Chip, проаналізовані за допомогою програмного забезпечення QuantStudio 3D Digital PCR AnalysisSuite Software.

Отримані результати реакції в подальшому відображаються у вигляді діаграми розкиду даних, на якій зображені сигнали флуоресценції: FAM-сигнали сінего кольору вказують на мутантні алелі, VIC-сигнали червоного кольору - алелі дикого типу, сигнали зеленого кольору - на комбінацію мутантного і дикого типу в одній лунці, сигнали жовтого кольору - лунки без ампліфікації [25] (рис. 3.15).

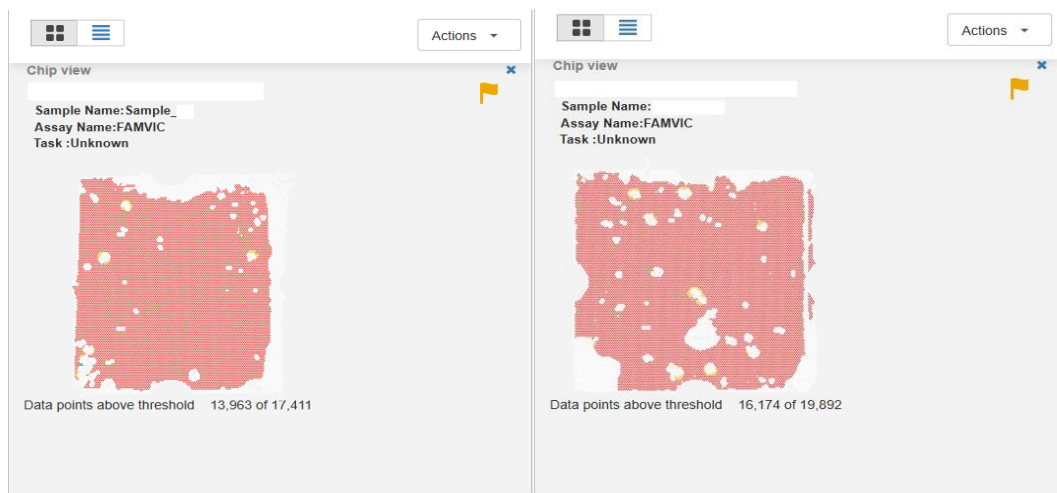


Рисунок 3.15 – Зображення чіпів з мутацією РІКЗСА в біопсії зразку і плазмі крові пацієнта.

Використовувані методики дозволили отримати кількісну оцінку мутації РІКЗСА в ДНК, виділеної з біопсійною тканини (рис. 3.16) і плазми крові пацієнтів (рис. 3.17). Дані представлені у вигляді кількості копій на мікролітр для алелей мутантного і дикого типів (в середньому 396,4 і 7457,98 копій / мікролітр в біопсійної зразках, а також 92,9 і 8054,6 копій / мікролітр в зразках плазми крові на етапі скринінгу).

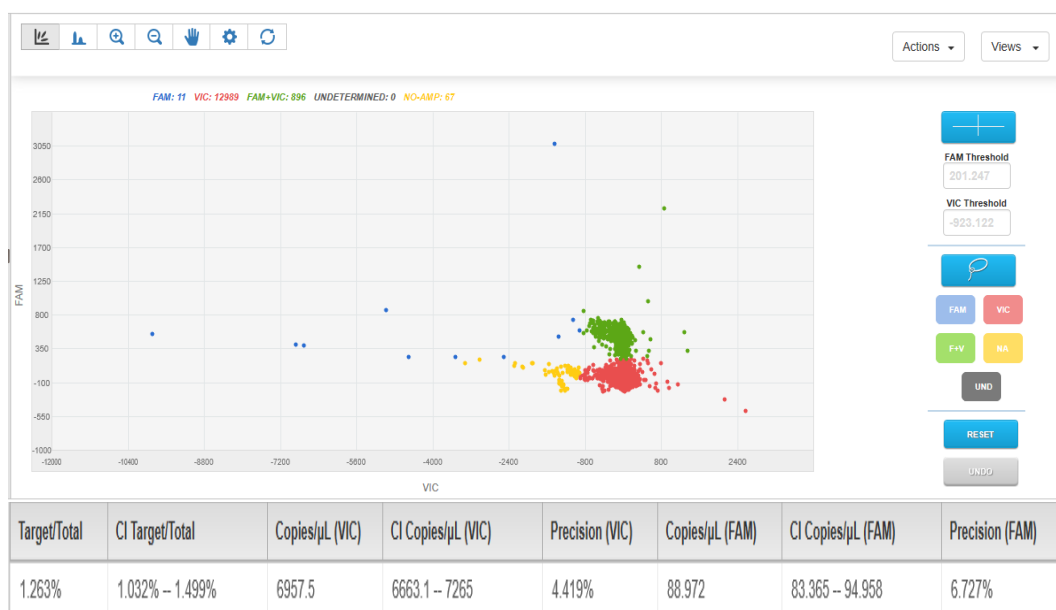


Рисунок 3.16 – Кількісні показники при визначенні мутації РІК3СА біопсійного зразка пухлини молочної залози

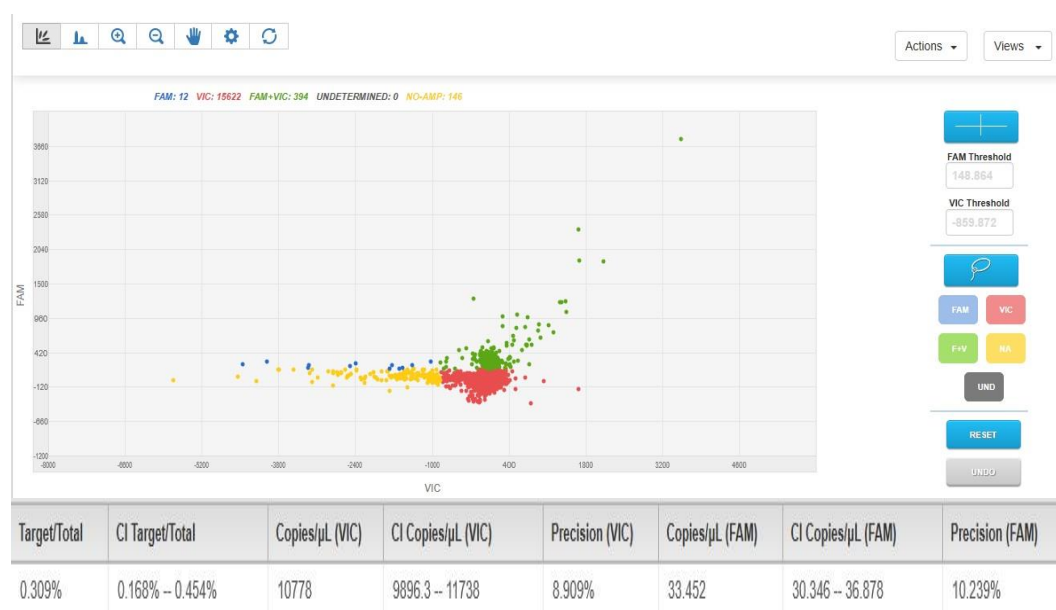


Рисунок 3.17 – Кількісні показники при визначенні мутації РІК3СА зразка плазми пацієнта з пухлиною молочної залози

Серед пацієнтів з виявленою РІК3СА-мутанта ДНК при иммуногистохімічному дослідженні виявлено експресію ER у 4 з 5 випадків, PR - в 3 випадках. Позитивною вважалася реакція при наявності більш 1% пухлинних клітин з ядерної забарвленням DAB (коричневий колір).

Her2 / neu-позитивна експресія (інтенсивна мембранна забарвлення в понад 10% пухлинних клітин) спостерігалася тільки в 1 зразку (рис. 3.18). Імуногістохімічні характеристики пухлин представлені в табл. 3.3. Виходячи з цього, можна стверджувати, що для РІКЗСА-мутантного РМЗ більш характерними є ER-позитивні і HER2-негативні пухлини.

Дослідження серійних зразків плазми пацієнтів з РІКЗСА-мутантним РМЗ показало, що зміни кількості цпДНК відбуваються протягом усіх циклів неoad'ювантної хіміотерапії, які відображають динаміку регресу захворювання. Оцінка відповіді на лікування, заснована на динаміці цоДНК плазми крові, порівняння з даними КТ, виконаної в ті ж проміжки часу.

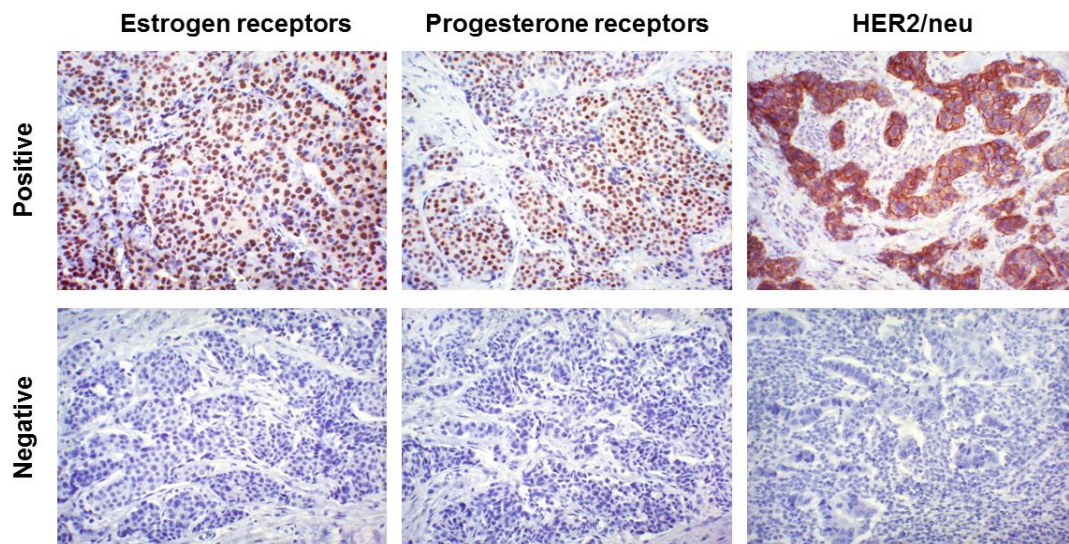


Рисунок 3.18 – Пухлина молочної залози. Імуногістохімічне фарбування ER, PR і Her2 / neu. Збільшення - x200.

На діаграмі (Рисунок 3.19) можна простежити зниження кількості цоДНК під час всіх циклів неoad'ювантної хіміотерапії і після операції. Найнижча концентрація спостерігається на 1-й і 5-й день після операції. У одного пацієнта в зразку плазми, взятої на 5-й день після операції, РІКЗСА-мутантна цпДНК повністю була відсутня.

Таблиця 3.3 – Імуногістохімічні параметри пухлин молочної залози.

Характеристика	Мутацію виявлено	не	PIK3CA-мутантний РМЗ
• ER			
Позитивний	18 (62%)		4 (13.5%)
Негативний	6 (21%)		1 (3.5%)
• PR			
Позитивний	15 (52%)		3 (10%)
Негативний	9 (31%)		2 (7%)
• HER2			
Позитивний	5 (17%)		1 (3.5%)
Негативний	19 (66%)		4 (13.5%)

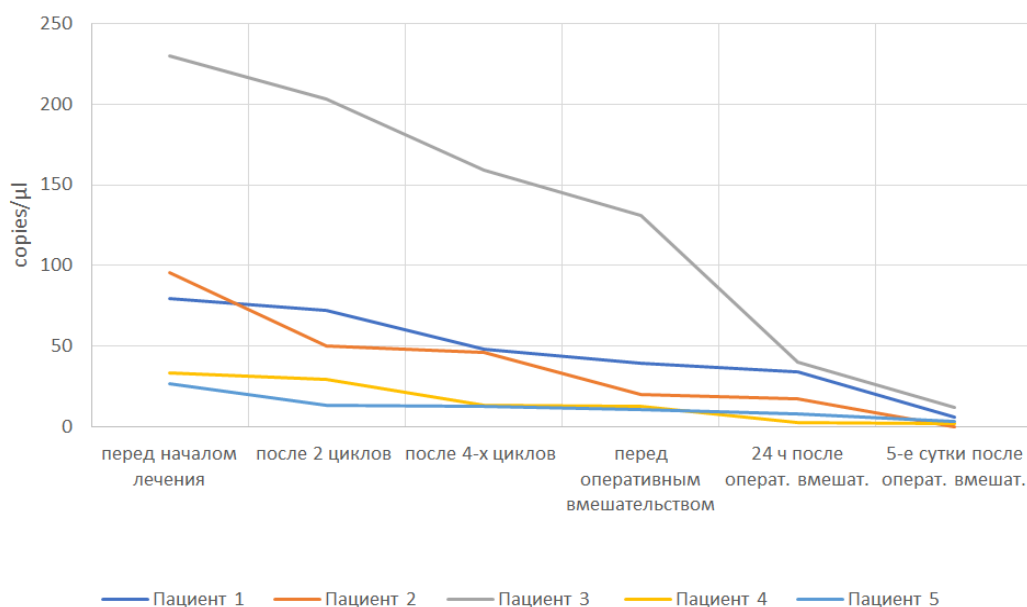


Рисунок 3.19 – Динаміка кількісних змін РІКЗСА-мутанта цоДНК у пацієнтів з РМЗ, досліджуваної під час лікування

«Золотим стандартом» онкодіагностики є морфологічна верифікація пухлини. Однак в ряді випадків встановлення гістотіпа новоутворення не представляється можливим: загальні протипоказання (важкий стан пацієнта), технічні перешкоди (відсутність відповідного обладнання або хірургічної

техніки), відсутність первинного вогнища при низькій диференціації пухлини, відмова пацієнтів від інвазивних травматичних процедур і інші. Оскільки зростання і розвиток пухлини супроводжується її частковим руйнуванням, то в кровоносну систему виділяються фрагменти нуклеїнових кислот, які можуть бути розпізнані по типовим мутаціям онкогенів [38,163,195-200]. «Liquid biopsy» характеризується потенційною здатністю виявляти мутації пухлинної ДНК в зразку крові, що дозволяє отримати простий, неінвазивний і кількісно вимірюваний метод для використання в клінічних умовах [201].

На сьогоднішній день PIK3CA є одним з найбільш часто мтованих онкогенів при РМЗ - 25-40% випадків [202]. Частота виникнення даної мутації істотно відрізняється при різних локалізаціях пухлин, наприклад, висока частота характерна для раку ендометрія, шийки матки - 17-37%, а низька - для раку легені, щитовидної залози - 4-5% [203]. У нашому дослідженні частота виявленої мутації PIK3CA в зразках пацієнтів з місцево-поширеним РМЗ склала 17%, що обумовлено пошуком лише одного «hotspot» варіанту мутації (H1047R). Мутація переважно асоціювалася з ER-позитивними та Her2-негативними фенотипами пухлин. Аналогічні дані, що підтверджують кореляцію між мутаційним статусом PIK3CA і Her2-позитивними пухлинами, були отримані і іншими дослідниками [204,205].

Середня кількість мутації PIK3CA на етапі скринінгу для алелей мутантного і дикого типу в біопсійній зразках склала в середньому 396,4 і 7457,98 копій / мікролітр, в зразках плазми крові - 92,9 і 8054,6 копій / мікролітр, відповідно. Про точність і надійність методики визначення PIK3CA-мутанта цпДНК за допомогою методу цифрової ПЛР свідчить порівнянність виявленої мутації в зразках пухлинної тканини і цоДНК плазми крові. Ця неінвазивна маніпуляція може бути повторена в процесі лікування через надійні, відтворювані і автоматизовані методи, здатні виявити геномні зміни з високою чутливістю, що робить «liquid biopsy» привабливою концепцією в онкології [206-208].

Протягом всіх циклів неоад'ювантної терапії і після оперативного втручання відзначалося зниження кількості цпДНК в плазмі, а найнижча концентрація спостерігалася на 1-й і 5-й день після операції. У одного пацієнта в зразку плазми, взятої на 5-й день після оперативного втручання, РІКЗСА-мутантна цпДНК повністю була відсутня. Отримані нами дані про зміни кількості РІКЗСА-мутанта цпДНК протягом різних етапів лікування допомагають відстежити динаміку пухлинного процесу, яку можна порівняти з результатами КТ-дослідження. Слід зазначити, що високий ступінь сумісності між виявленням мутацій РІКЗСА в пухлинній тканини і у відповідній цпДНК також було виявлено та в інших дослідженнях. Саме тому РІКЗСА-мутантна цпДНК може бути використана в якості раннього маркера для оцінки відповіді на лікування РМЗ на додаток методам візуалізації [200,201,209-211].

Очікується, що дослідження цпДНК у хворих на РМЗ з допомогою цифрової ПЛР може стати додатковим діагностичним і прогностичним маркером, який дозволить не тільки здійснювати моніторинг ефективності проведеного лікування, а й послужить надійним методом раннього виявлення рецидиву захворювання, дозволить проводити діагностику злоякісних пухлин різної локалізації на самому ранньому етапі розвитку, індивідуалізувати терапію, знизити витрати системи охорони здоров'я на лікування та суттєво підвищити загальну виживаність хворих.

Дані стосовно безрецидивної виживаності і загальної виживаності пацієнтів з РІКЗСА-мутантом РМЗ, в порівнянні з пацієнтами без виявленої РІКЗСА мутантною цпДНК, будуть представлені в наступних наукових працях [200].

Результати за даним напрямком роботи опубліковані виконавцями науково-дослідної роботи у наступних працях:

Линдін М.С., Романюк А.М. Інвазивний рак неспецифічного типу молочної залози: гістологічні та імуногістохімічні особливості / Challenges of

medical science and education: an experience of EU countries and practical introduction in Ukraine : Collective monograph. – Riga: Izdevnieciba “Baltija Publishing”, 2020. – С. 264–281.

Линдін МС, Романюк АМ, Сікора ВВ, Зінгер ББ. Молекули клітинної адгезії раково-ембріонального антигену (СЕАСАМs): монографія. – Суми: СумДУ, 2020. – 219 с.

Kolomiets O., Yazykov O., Lukavenko I., Andriushchenko V., Romaniuk A., Moskalenko R. The existence of calcifications in breast cancer tissue doesn't affect expression of HER2-neu protein. *Virchows Archiv.* 2020. – 447 (Suppl 1): S 226.

Sikora V, Lyndin M, Hyriavenko N, Moskalenko R, Piddubnyi A, Karpenko L, Romaniuk A. Expressed cartilaginous and osseous metaplasia in breast cancer: histological and immunohistochemical aspects. *Virchows Archiv.* 2019. – 449 (Suppl 1): S 91.

Привалова А.О., Винниченко І.О., Гарбузова В.Ю., Винниченко О.І., Москаленко Ю.В. Роль мутацій гена PIK3CA в розвитку раку грудної залози (огляд літератури). *Запорізький медичний журнал.* 2020;22-4(121):554-60.

Винниченко І.О., Привалова А.О., Смородська О.М., Винниченко О.І., Москаленко Ю.В. Рідинна біопсія: перспективи застосування в онкології (огляд літератури). *Art of Medicine.* 2018;1(5):85-91.

Vynnychenko IO, Pryvalova AO, Vynnychenko OI, Lyndin MS, Sikora VV, Romaniuk AM. PIK3CA-mutant circulating tumor DNA in patients with breast cancer. *Azerbaijan Medical Journal (ATJ).* 2020;3:79-88. DOI: 10.34921/amj.2020.3.010

3.3 Дослідження морфологічних та імуногістохімічних особливостей раку 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 [212-218]. Для дослідження були відібрані зразки тканин раку передміхурової залози з наявністю та відсутністю інтралюмінальних включень (простатоліти, сохрога amylasea). Всього було вивчено 30 зразків раку передміхурової залози з включеннями (експериментальна група, E) та 30 зразків раку передміхурової залози без них (контрольна група, K). Контрольна та експериментальна групи були розділені на 2 підгрупи в залежності від ступеню злякисності, котрий був визначений за шкалою Глісона на пухлини з помірним (K2 та E2) та низьким (K3 та E3) 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) [213].

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 4×10^{-6} м. Депарафінізовані зрізи забарвлювали гематоксиліном та еозином.

Імуногістохімічне дослідження тканини раку передміхурової залози

Серійні зрізи товщиною 4×10^{-6} м, виготовлені з підготовлених гістологічних парафінових блоків, наносили на адгезивні скельця SuperFrost (Thermo Scientific) і висушували за температури 37°C упродовж 18 годин. Депарафінізовані зрізи підлягали демаскуванню антигенів термічним методом шляхом нагрівання зрізів у цитратному буфері (рН 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. 3.4).

Таблиця 3.4 – 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. 3.19). Деякі з пухлинних залоз відокремлювалися та мали вигляд ланцюга. Більшість залоз мала просвіт.

Тканина зразків раку передміхурової залози групи E3 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. 3.20).

Зразки експериментальної групи (E2 та E3) 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. 3.21). 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 E2 та E3 показало виразну ядерну реакцію у пухлинних клітинах карциноми та поодиноких клітинах навколопухлинної строми. Кількість позитивних клітин для підгрупи E2 відповідало $396,79 \pm 26,02$, для підгрупи E3 $360,91 \pm 36,87$ пухлинних клітин у полі зору (рис. 3.20, 3.21). Кількість позитивно-забравлених ядер для зразків підгруп K2 та K3 становило $417,17 \pm 39,61$ та $424,88 \pm 53,76$ клітин в полі зору відповідно (рис. 3.22, 3.23) [213].

Рівень експресії проапоптотичного p53-протеїну у зразках пухлинної тканини підгруп E2 та E3 становив $33,09 \pm 3,30$ та $46,70 \pm 2,15$ клітин в полі

зору відповідно (рис. 3.20, 3.21). 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. 3.22, 3.23).

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. 3.20, 3.21). 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. 3.22, 3.23) [213].

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. 3.20, 3.21). 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. 3.22, 3.23) [213].

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. 3.20, 3.21). 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. 3.22, 3.23). 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. 3.20, 3.21). 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. 3.22, 3.23).

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. 3.20, 3.21). У підгрупах K2 та K3 було виявлено $32,54 \pm 2,46$ та $41,13 \pm 2,45$ MMP1-позитивних клітин відповідно (рис. 3.22, 3.23) [213].

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. 3.20, 3.21). Для підгруп K2 та K3 цей показник становив $85,60 \pm 5,22$ та $98,70 \pm 6,09$ позитивних клітин відповідно (рис. 3.22, 3.23).

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. 3.20, 3.21). Підгрупи K2 та K3 мали $43,10 \pm 3,44$ та $30,50 \pm 2,88$ OSN-позитивних неопластичних клітин (рис. 3.22, 3.23) [213].

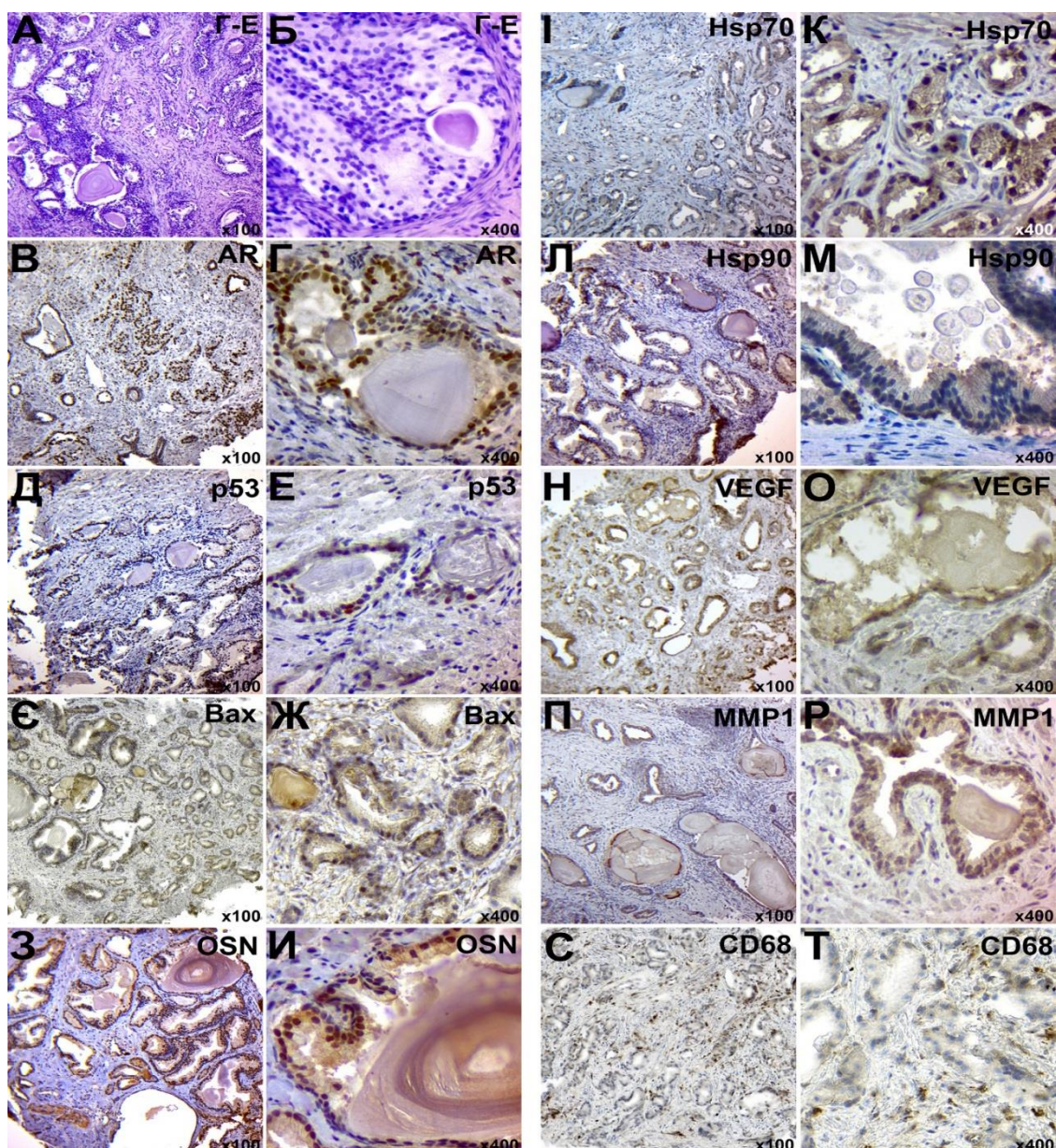


Рисунок 3.20 – Імуногістохімічне дослідження тканини раку передміхурової залози експериментальної групи, помірного ступеня диференціації (E2): А–Б – забарвлення гематоксиліном та еозином; В–Г – ІГХ виявлення AR; Д–Е – ІГХ ідентифікація білка p53; Є–Ж – ІГХ виявлення білка Vax; З–И – ІГХ дослідження експресії 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.

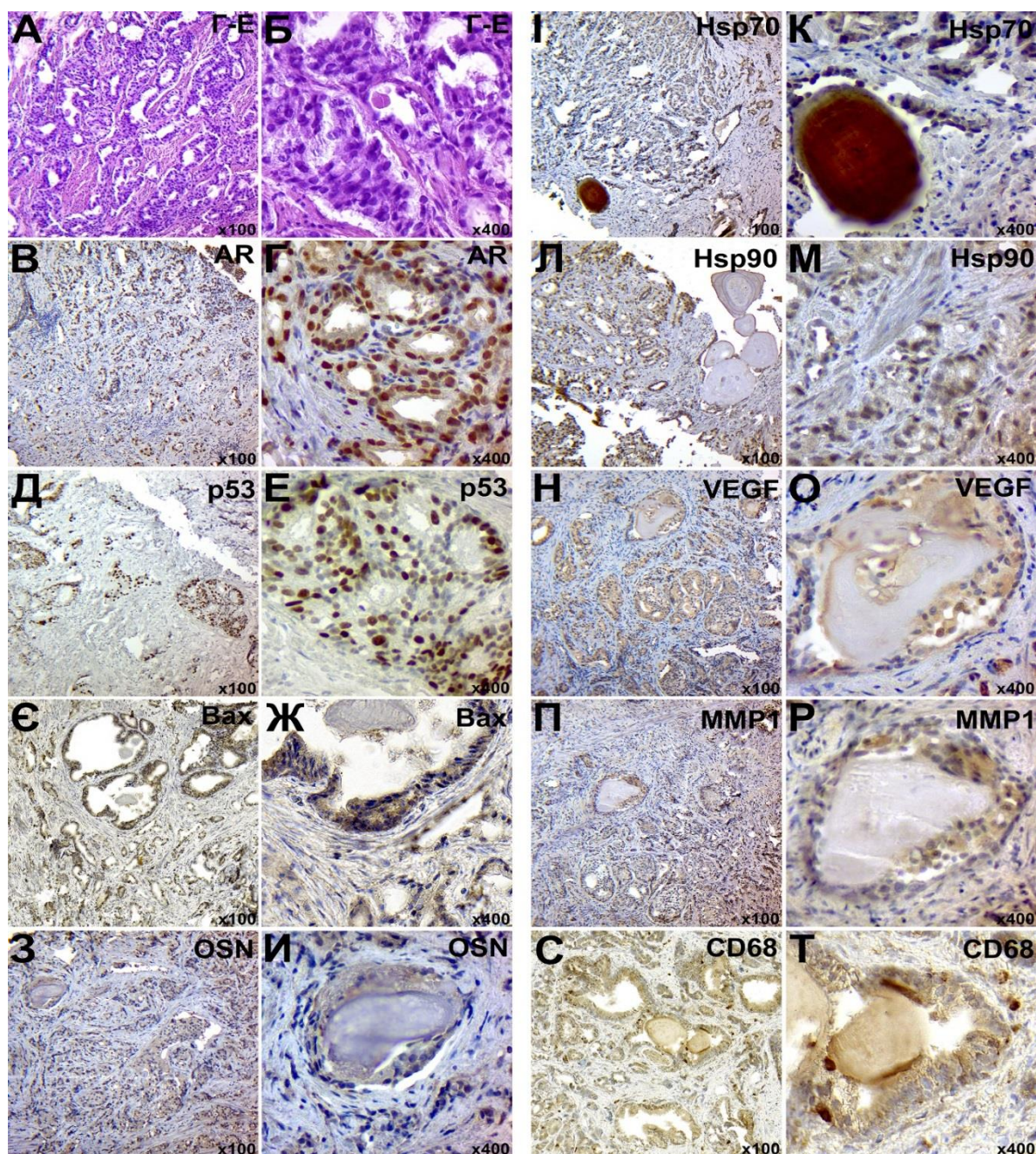


Рисунок 3.21 –Імуногістохімічне дослідження тканини раку передміхурової залози експериментальної групи, низького ступеня диференціації (Е3): А–Б – забарвлення гематоксиліном та еозином; В–Г – ІГХ виявлення AR; Д–Е – ІГХ ідентифікація білка p53; Є–Ж – ІГХ виявлення білка Вах; З–И – ІГХ дослідження експресії 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.

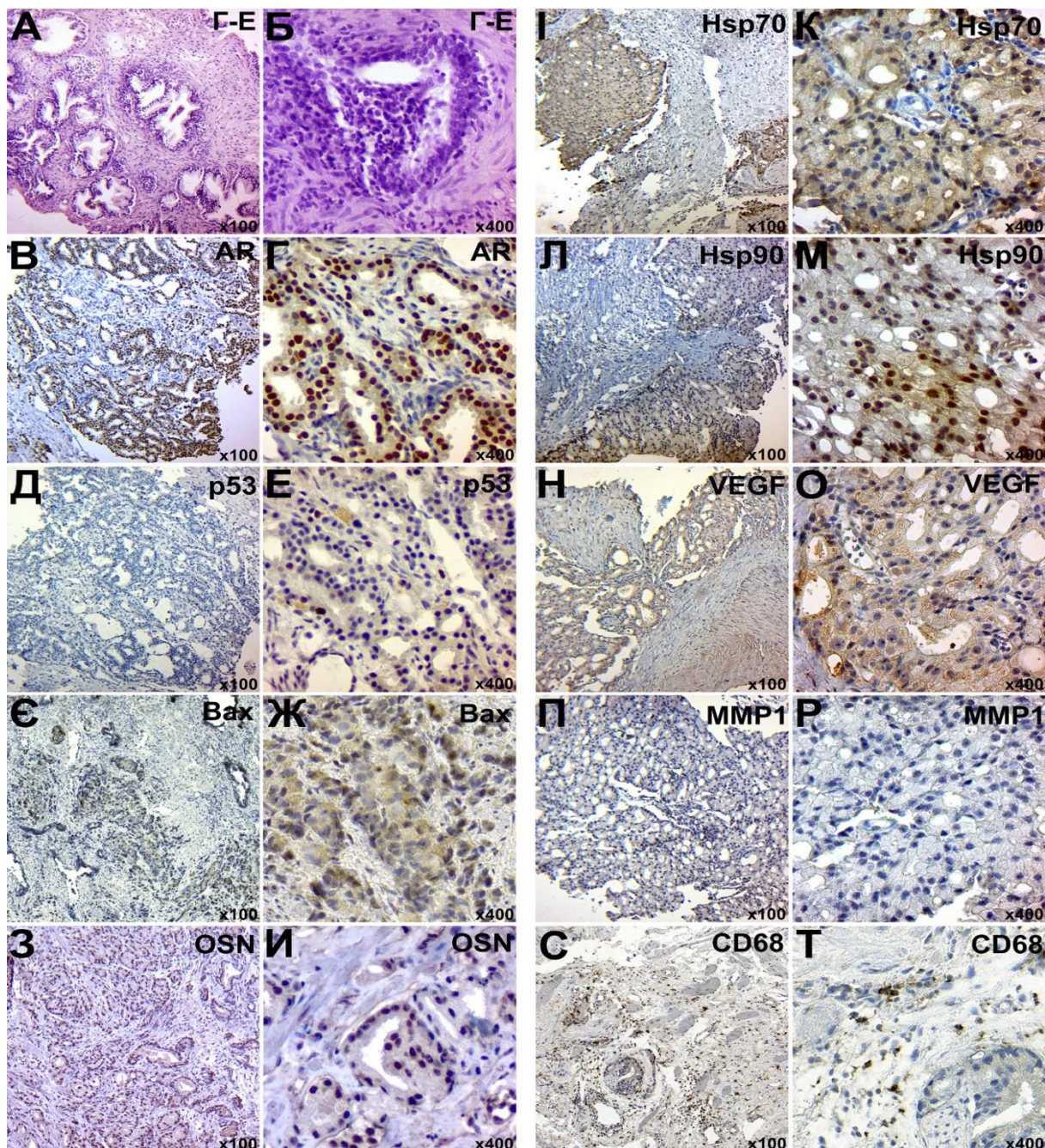


Рисунок 3.22 –Імуногістохімічне дослідження тканини раку передміхурової залози контрольної групи, помірного ступеня диференціації (K2): А–Б – забарвлення гематоксиліном та еозином; В–Г – ІГХ виявлення AR; Д–Е – ІГХ ідентифікація білка p53; Є–Ж – ІГХ виявлення білка Vax; З–И – ІГХ дослідження експресії 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.

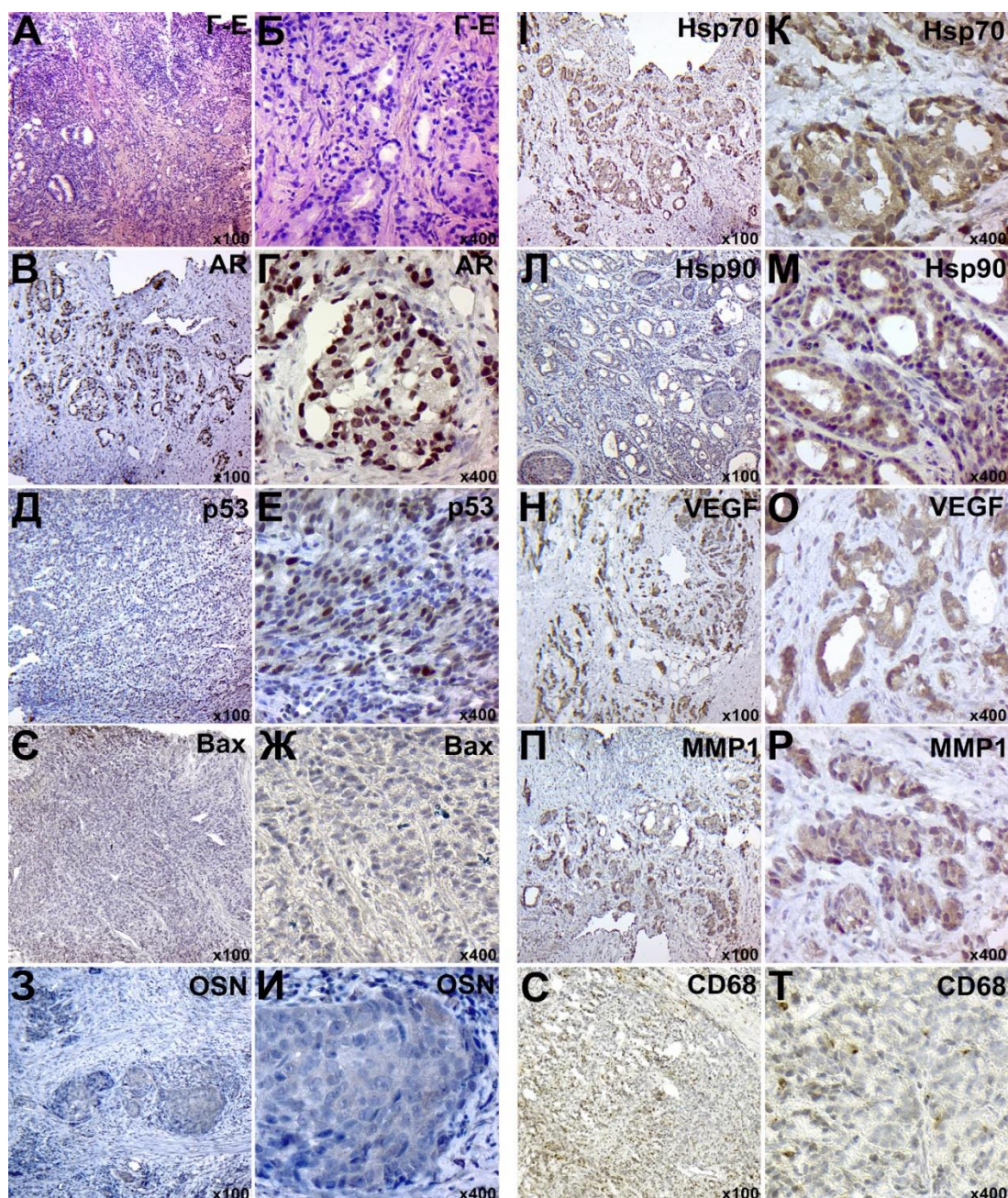


Рисунок 3.23 – Імуногістохімічне дослідження тканини раку передміхурової залози контрольної групи, низького ступеня диференціації (К3): А–Б – забарвлення гематоксиліном та еозином; В–Г – ІГХ виявлення AR; Д–Е – ІГХ ідентифікація білка p53; Є–Ж – ІГХ виявлення білка Vax; З–И – ІГХ дослідження експресії 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.

У свою чергу, аналіз результатів морфологічних та молекулярно-генетичних досліджень раку передміхурової залози дозволив сформувати 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 [213].

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 [213-215].

Неопластична тканина зразків контрольної групи характеризувалася відсутністю ІлВ. Також відмічалось 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 муциозна трансформація та крововиливи [213-218].

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. Раніше повідомлялося про зв'язок між експресією AR та функціональною активністю неопластичної тканини та оцінкою за шкалою Глісона [218]. 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 [219].

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) [220]. 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. 3.24). 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 р53 притаманна переважно пухлинам високого ступеня злоякісності і супроводжується погіршенням прогнозу захворювання та зменшенням тривалості життя пацієнтів [216-218,221].

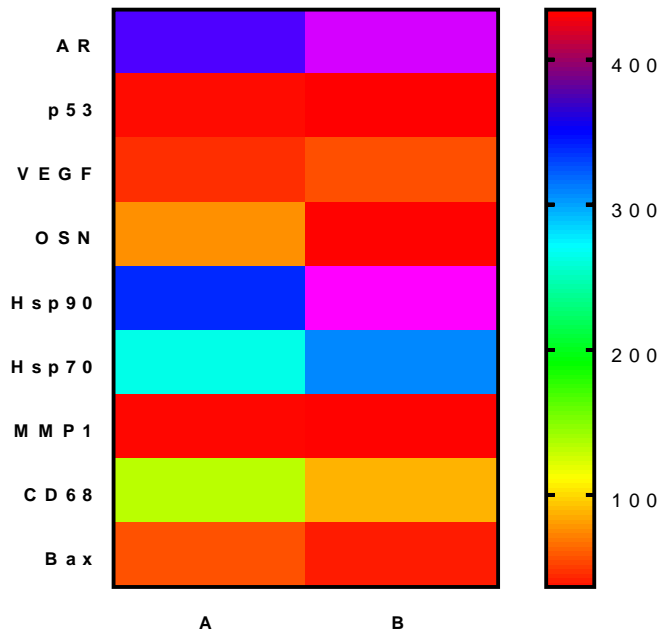


Рисунок 3.24 – Середні рівні експресії AR, p53, VEGF, OSN, Hsp90, Hsp70, MMP1, CD68 та Вах у тканині раку передміхурової залози експериментальної (А) та контрольної (В) груп.

Аналіз експресії Вах показав наявність достовірної різниці між експериментальною та контрольною групами. Але статистично значущої різниці в результатах експресії Вах 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 Вах не була встановлена (рис. 3.25). Однак раніше, зокрема у дослідження Лі-Ян Хор (2006), вказувалося на пряму залежність експресії Вах від оцінки пухлини за шкалою Глісона та

зробив висновок, що більш агресивні пухлини мають підвищену експресію Вах [213-218,222,223].

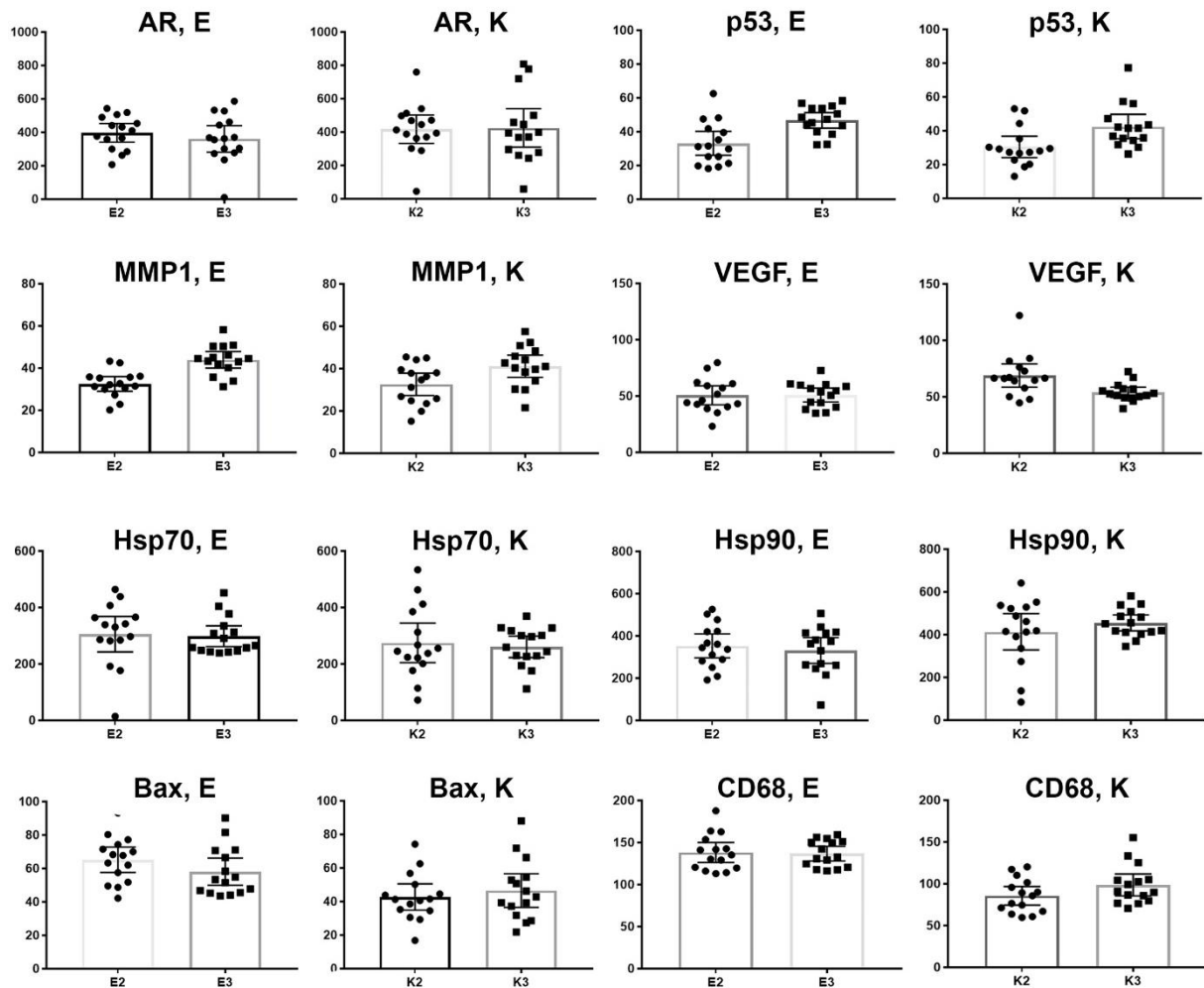


Рисунок 3.25 – Статистичне дослідження експресії AR, p53, MMP1, VEGF, Hsp70, Hsp90, Вах, CD68 та OSN у тканині раку передміхурової залози експериментальної та контрольної груп в залежності від ступеня диференціювання. Стовпчик вказує на середнє значення показника, бар – 95% інтервал достовірності.

Раніше була встановлена роль Hsp70 та Hsp90 у процесах пригніченні апоптозу шляхом інгібування проапоптотичних протеїнів (зокрема, каспаз) [224]. У нашому дослідженні було виявлено статистично значущу різницю між експресією Hsp90 в експериментальній та контрольній групах. 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. 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. Хоча більшість досліджень вказують на незначну роль високомолекулярних білків теплового шоку в процесах канцерогенезу [213,225], виявлено їх зв'язок з ризиком розвитку метастатичного раку молочної залози [226]. 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 [216-218,227]. 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 [213,228].

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 [229]. Нами не було встановлено статистично значущої різниці експресії MMP-1 між експериментальною та контрольною групами. 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). Ці результати підтверджуються результатами, отриманими д-р Джонг та ін. (2008), за якими було вказано на кореляцію між експресією MMP-1 та стадією захворювання [230]. 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 [231].

Підвищена експресія VEGF пухлинною тканиною вважається прогностично несприятливим фактором [232]. Наші результати свідчать про достовірно вищу експресію VEGF у зразках пухлинної тканини контрольної групи. Також було встановлено підвищену експресію VEGF в підгрупі C2 порівняно з підгрупою C3. 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 [213,233,234].

Нами було встановлено достовірно вищу кількість CD68-позитивних клітин в зразках раку передміхурової залози експериментальної групи. 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 [235]. 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 [236]. Під час дослідження ми виявили достовірно вищий рівень експресії OSN у зразках раку передміхурової залози експериментальної групи. 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

($p < 0,05$). За даними К. Якоб та ін. (1999), OSN специфічно підвищує активність матричних металопротеїназ і сприяє міграції неопластичних клітин та розвитку кісткових метастазів [237]. 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 [213].

Результати за даним напрямком роботи опубліковані виконавцями науково-дослідної роботи у наступних працях:

Линдін МС, Романюк АМ, Сікора ВВ, Зінгер ББ. Молекули клітинної адгезії раково-ембріонального антигену (CEACAMs): монографія. – Суми: СумДУ, 2020. – 219 с.

Piddubnyi A, Romaniuk A, Radomychelski IM, Moskalenko Y, Moskalenko R. Prostate Cancer with Intraluminal Inclusions: the Association of the Immunophenotype with Grade Score. Iran J Pathol. 2019;14(3):212-22. DOI: 10.30699/ijp.2019.91400.1884.

Piddubnyi A, Danylchenko S, Romaniuk A, Moskalenko R. Prostatic calculi cause osteoblastic immunophenotype of prostate cancer. Pathology. 2019;16, № 2(46):170–6. DOI: 10.14739/2310-1237.2019.2.177099

Piddubnyi A., Moskalenko R. Molecular aspects of the bone metastases development in prostate cancer. Eastern Ukrainian Medical Journal. 2019;7(2):96-108. DOI: [https://doi.org/10.21272/eumj.2019;7\(2\):96-108](https://doi.org/10.21272/eumj.2019;7(2):96-108).

Piddubnyi A, Moskalenko R, Romaniuk A. Intraluminal inclusions cause apoptosis in prostate cancer tissue. Virchows Archiv. 2020. – 447 (Suppl 1): S 166.

Lyndin M, Piddubnyi A, Sikora V, Romaniuk O, Kravtsova O, Romaniuk A. The features of p53 and Ki-67 expression during Gleason's grade increase in prostate cancer. Virchows Archiv. 2019. – 449 (Suppl 1): S 197.

Romaniuk A., Piddubnyi A, Lyndin M, Sikora V, Gyryavenko N, Moskalenko R. Prostate cancer leads to a change in the composition of tissue carbohydrates. Virchows Archiv. 2019. – 449 (Suppl 1): S 435-36.

Дисертація кандидата медичних наук: Піддубний Артем Михайлович, «Патоморфологічна характеристика біомінералізації при раку передміхурової залози», спеціальність 14.03.02 – патологічна анатомія, науковий керівник – д.мед.н., доц. Москаленко Р.А., 2020, Запорізький державний медичний університет

3.4 Гістологічні характеристики раку яєчка

Враховуючи те, що найчастіше серед усіх пухлин яєчок зустрічається семінома, ми зупинились на більш детальному вивченні її морфологічних особливостей (рис. 3.26) [56]. Макроскопічно яєчко вражене неопластичним процесом дещо збільшене в розмірі та має бугристу поверхню. Залежно від стадії, у деяких препаратах виявлено поширення пухлини на придаток та сім'яний канатик. На розрізі вузли сірувато-рожевого кольору, подекуди з вогнищами некрозів та крововиливів. Мікроскопічно пухлина представлена світлими клітинами з мноморфними округлими та овальними ядрами з патологічними мітозами. У тканині неоплазії виявляються полісадоподібні структури, групи залоз, солідні поля пухлинного росту розділені прошарками сполучної тканини, мікрокісти, осередки некрозів та крововиливів, а також поодинокі гігантські одноядерні клітини синцитіотрофобласта. Серед пухлинного мікрооточення наявна виражена запальна лімфоцитарна інфільтрація, яке представлене переважно Т-лімфоцитами. У деяких гістологічних препаратах візуалізується проростання новоутворення в оболонку яєчка, судинна інвазія та поширення на сім'яний канатик.

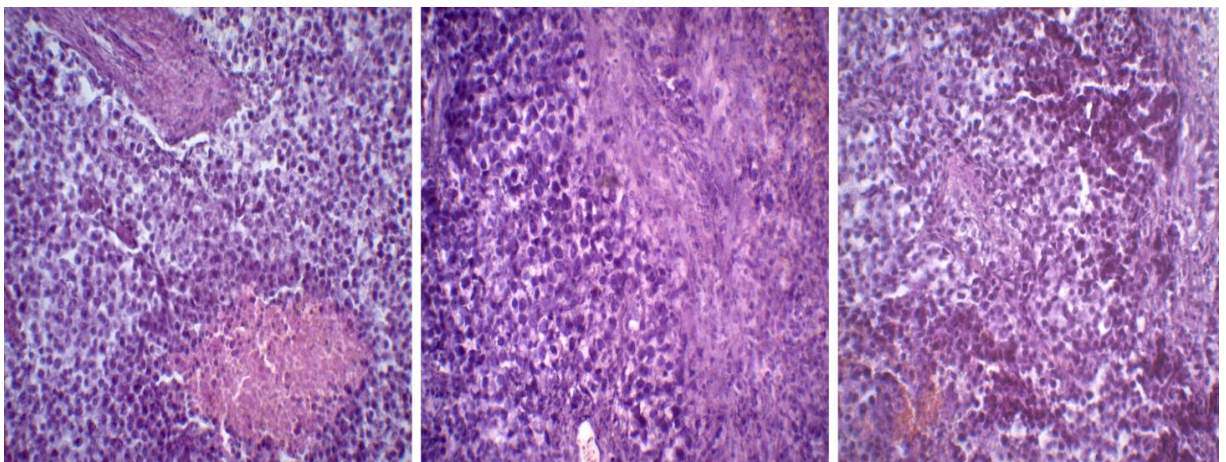


Рисунок 3.26 – Гістологічна картина семіноми. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення: x200.

Результати за даним напрямком роботи опубліковані виконавцями науково-дослідної роботи у наступних працях:

Brusovtsov D, Lyndin M, Sikora V, Hyriavenko N, Romaniuk A. Research on the incidence of malignant testicular tumors in Ukraine and Sumy region. Eastern Ukrainian Medical Journal. 2020;8(2):145-152.

3.5 Імуногістохімічні характеристики раку маткових труб

Дослідження проведено на операційному матеріалі, отриманому від 71 пацієнтки з ПРМТ 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 Масра.

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. 3.5).

Таблиця 3.5 – 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+) – слабе цитоплазматичне забарвлення більше 10% пухлинних клітин; помірний (2+) – забарвлення середньої інтенсивності більше 10%; високий (3+) – інтенсивне забарвленні більше 10% пухлинних клітин
VEGF	Кролик	Поліклон	1:200	Цитоплазма та мембрана	0 балів – відсутність цитоплазматичної експресії, 1 бал – слабе 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 ПРМТ 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 МТ у

переважній більшості випадків (60,6%) виявляються на I–II стадіях захворювання [238-242].

Отримані нами результати гістологічного дослідження показують, що переважну більшість злоякісних новоутворень МТ складала САкМТ (93.0% випадків) (рис. 3.27).

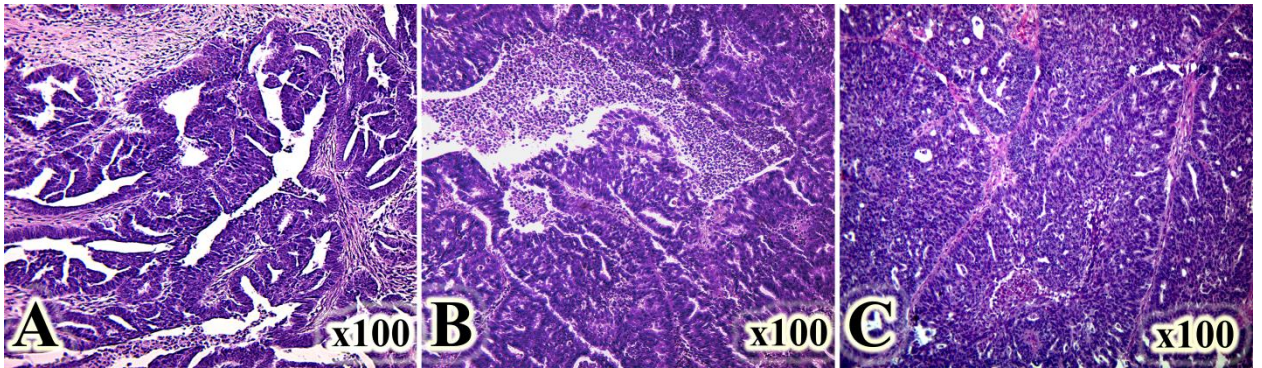


Рисунок 3.27 – САкМТ маткової труби. А – G1(низького ступеня злоякісності); В – G2(високого ступеня злоякісності); С – G3(високого ступеня злоякісності). Забарвлення гематоксиліном та еозином.

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 (G₂, G₃).

Імуногістохімічне дослідження виявило варіабельну експресію до рецепторів естрогену (ER) та прогестерону (PR) (рис. 3.28): ER+PR+ – 62.1%, ER+PR– – 21.2%. Висока експресія ER і PR у серозних пухлинах МТ 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) [238-242].

У більшості випадків клітини неоплазій МТ експресували рецептори до білка Кі-67 (рис. 3.28), 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% Кі67-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. 3.27). 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. 3.28). 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. 3.6) [238-242].

Таблиця 3.6 – 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 ± 2.2
	II	46.8 ± 5.2
	III	71.7 ± 3.9
Наявність ураження регіональних лімфатичних вузлів	N ₀	29.7 ± 3.6
	N ₁	80.6 ± 2.7
Ступінь диференціювання пухлини	G ₁	5.6 ± 2.4
	G ₂	35.6 ± 6.2
	G ₃	62.2 ± 4.2

У 81.8% випадків пухлини МТ 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 ($r=-0.39$, $p<0.01$) [238-242].

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. 3.28).

Ми установили, що ангиогенний потенціал злоякісних пухлин МТ 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 ПРМТ від ангиогенезу. У цілому стероїд-негативні пухлини МТ 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 ($p>0.05$) [238-242].

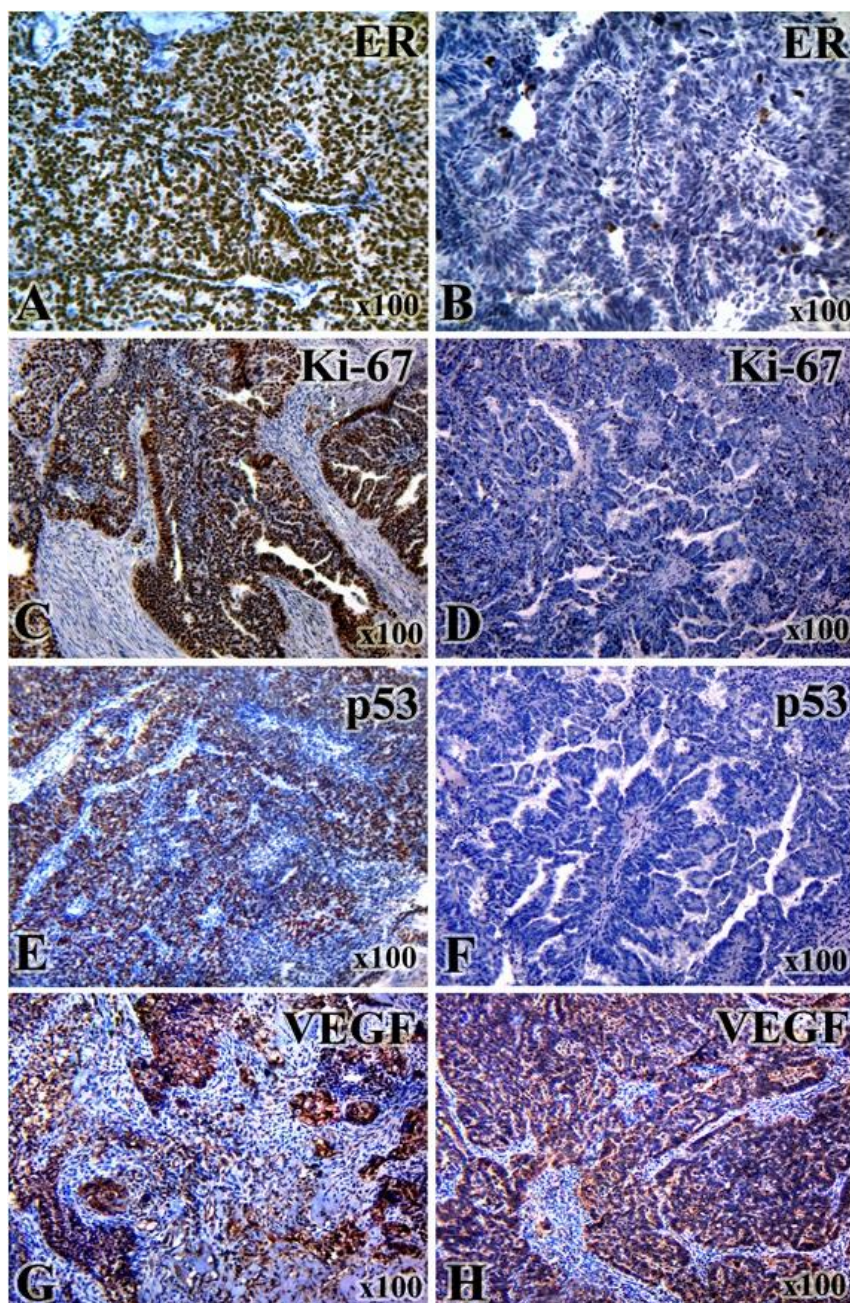


Рисунок 3.28 – Серозна аденокарцинома маткових труб.

Імуногістохімічне дослідження експресій ER, Ki67, p53 та VEGF.

У численних наукових публікаціях, які присвячені питанню ПРМТ, описуються переважно поодинокі спостереження цього захворювання [238-244]. Вікові особливості хворих на злоякісні новоутворення МТ досить характерні, що може бути пов'язано зі збільшенням кількості секреторних клітин у жінок з віком, роль яких у розвитку серозних неоплазій чітко доведена [245,246]. Морфологічно злоякісні епітеліальні пухлини МТ можуть бути представлені карциномами усіх клітинних типів. У нашому дослідженні

переважну більшість злоякісних новоутворень складала САкМТ з високим ступенем злоякісності, що характеризує цю пухлину як дуже агресивну.

Наявність у пухлинах МТ рецепторів стероїдних гормонів – важливий показник для застосування гормонотерапії. 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 МТ [247-249]. 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 МТ. При прогресуванні пухлинного процесу виникає функціональне та рецепторне спрощення пухлинних клітин і кількість рецепторів до стероїдних гормонів знижується (підвищення ступеня автономності пухлини) [238-242].

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 МТ асоціюється з інвазією, метастазуванням і, як наслідок, несприятливим перебігом захворювання [238-242].

Результати нашого дослідження демонструють, що гіперекспресія HER2/neu не характерна для ПРМТ, враховуючи майже повну її відсутність у пухлинній тканині. На противагу нашому дослідженню, надлишкова експресія HER2/neu у непластичній тканині МТ була продемонстрована деякими авторами в 25,6% [251], 31% [252] та 89% [253] випадках САкМТ. Згідно наших досліджень, визначення даного онкопротеїну ми не можемо рекомендувати при прогнозуванні перебігу злоякісного процесу.

Як показують результати нашого дослідження, середнє значення Кі-67 становило $55.0 \pm 12.2\%$. Частіше траплялися пухлини в МТ з індексом проліферації більше 60% (54.5%). Аналізуючи вищезазначене, можна стверджувати, що ПРМТ є пухлиною з високою проліферативною активністю, що свідчить про надзвичайно агресивний перебіг захворювання. Ураховуючи більш високу проліферативну активність клітин ПРМТ із наявністю метастазів, ступінь експресії Кі-67 можна вважати незалежним прогностичним маркером для N-статусу, тобто сприяє виділенню пацієнток у групи «ризик».

Дані, які ми отримали, свідчать проти відсутності лінійної залежності між стероїдним статусом клітин та їх здатністю до поділу і засвідчують існування більш складних гормональних шляхів впливу на проліферацію. Враховуючи значне зростання проліферативної активності за умов PR-статусу клітин, можна стверджувати про більш значний вплив прогестерону на здатність клітин до поділу [238-242].

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. При надлишковій кількості мутантного p53 відбувається зменшення кількості дикого p53, що призводить до пригнічення блокування вищезазначених ланок апоптозу, а це, у свою чергу, дає клітині можливість до подальшого функціонування, ділення клітини стає некерованим процесом, і злоякісний процес активно прогресує (рис. 3.29) [238-242].

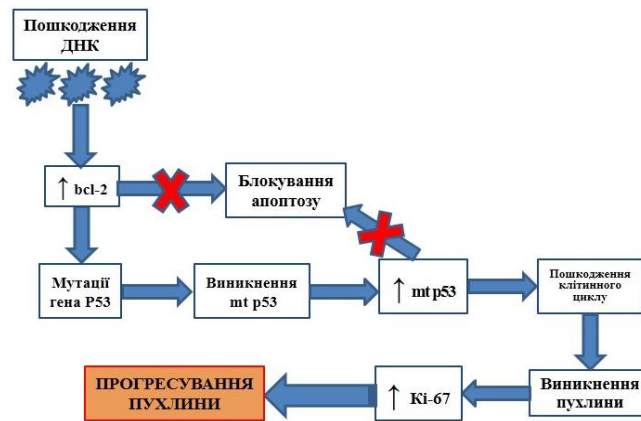


Рисунок 3.29 – Схема участі mt p53 у канцерогенезі ПРМТ.

Нами встановлено, що p53+-статус САкМТ корелює з високим ступенем злоякісності, значним поширенням пухлинного процесу, наявністю метастазів та високим рівнем проліферації. Тобто він може виступати незалежним прогностичним фактором при ПРМТ. Крім того, проведені дослідження показали, що bcl-2+-статус пухлин цієї локалізації корелює з позитивним статусом рецепторів стероїдних гормонів, низьким ступенем анаплазії та низьким рівнем проліферації. 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 ПРМТ. Це, ймовірно, пояснюється поєднанням експресії bcl-2 та рецепторів стероїдних гормонів, оскільки ген Bcl-2 є естроген-залежним геном [253,254].

У пухлинах МТ, які активно розвиваються, відбувається інтенсивне проростання і утворення нових кровоносних судин – ангіогенез. У певний момент у пухлині з'являються клітини («ангіогенетичне вмикання»), які здатні його стимулювати. Пухлинні клітини починають утворювати і вивільняти ангіогенетичні фактори (напр., VEGF), які стимулюють розмноження ендотеліальних клітин та ріст капілярів [255,256]. У нашій роботі встановлено, що в більшості хворих (87.9 %) була виявлена помірна або сильна цитоплазматична реакція цього маркера в ендотеліальних

клітинах та більше, ніж у 70 % пухлинних клітинах, розміщених дифузно в усіх полях зору. Відповідно ангиогенез у ПРМТ проходить постійно і дуже інтенсивно, що зумовлює їх швидкий ріст та має несприятливе прогностичне значення. Нами встановлено, що ангиогенний потенціал злоякісних пухлин МТ корелює з рівнем дедиференціювання неоплазії, клінічною стадією захворювання, негативним статусом рецепторів стероїдних гормонів, її p53-позитивним статусом ($p < 0.05$). Усі випадки метастазування у регіонарних лімфатичних вузлах супроводжувалися високою експресією рецепторів VEGF [238-242].

Таким чином, у нашій роботі в результаті комплексного морфологічного дослідження ПРМТ одержані дані, які потрібно враховувати при визначенні стратегії та плануванні індивідуальної тактики лікування хворих на злоякісні пухлини МТ (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 ангиогенному потенціалі неоплазій) [238-242].

Результати за даним напрямком роботи опубліковані виконавцями науково-дослідної роботи у наступних працях:

Hyriavenko N, Lyndin M, Sikora K, Piddubnyi A, Karpenko L, Kravtsova O, Hyriavenko D, Diachenko O, Sikora V, Romaniuk A. Serous Adenocarcinoma of Fallopian Tubes: Histological and Immunohistochemical Aspects. J Pathol Transl Med. 2019 Jul;53(4):236-43. DOI: 10.4132/jptm.2019.03.21.

Sumtsov DG, Hyriavenko NI, Sikora VV, Lyndin NS, Sumtsov GA. Ways of spread and metastasis of primary fallopian tube cancer: retrospective analysis from 1967 to 2019. Azerbaijan Medical Journal (ATJ). 2020;3:70-8. DOI: 10.34921/amj.2020.3.009

Hyriavenko N, Lyndin M, Sikora V, Kravtsova O, Sumtsov D, Hyriavenko D, Romaniuk A. Synchronous case of the primary neuroendocrine cancer of

fallopian tube and serous papillary cancer of ovary. *Virchows Archiv.* 2019. – 449 (Suppl 1): S 330.

Hyriavenko N., Lyndin M, Sikora V., Karpenko L, Moskalenko R, Piddubnyi A, Romaniuk A. Peculiarities of vascularization of serous adenocarcinoma of fallopian tubes. *Virchows Archiv.* 2020. – 447 (Suppl 1): S 65.

Гирявенко НІ, Линдін МС, Сікора ВВ, Гирявенко ДР, Романюк АМ. Прогностичне значення експресії VEGF у тканині серозної аденокарциноми маткових труб. *Art of medicine.* 2018;3(7):30-34. <http://art-of-medicine.ifnmu.edu.ua/index.php/aom/article/view/93>

ВИСНОВКИ

Результати даної науково-дослідної роботи формують теоретично-практичну платформу наукових показників, що можуть бути використані для підвищення якості діагностики та лікування злоякісних новоутворень різноманітних локалізацій за допомогою використання методу «liquid biopsy».

1. Використання рідинної біопсії є перспективним напрямом сучасної скринінгової діагностики неоплазій у практиці лікаря онколога. Запропоновано постановку технічного забезпечення для вивчення «liquid biopsy» та теоретичну схему розв'язання задач імунотерапією. Простота та швидкість проведення маніпуляції дозволяють виявляти молекулярно-генетичні особливості пухлинної тканини різноманітної локалізації тільки за результатами дослідження біологічних рідин.

2. Встановлено статистичні критерії захворюваності на злоякісні новоутворення легень, молочної залози, матки, яєчників, МТ, передміхурової залози та яєчок в Сумській області та в Україні. Аналіз показників захворюваності та смертності від найпоширеніших злоякісних новоутворень у Сумській області вказав на їх варіації на значно високому рівні. Показники пухлинної захворюваності Сумській області є дещо нижчими від загальноукраїнських, проте їх мінливість залежить від досліджуваного регіону. Встановлено, що злоякісні пухлини основних локалізацій також можуть вражати дитяче населення, хоча це і зустрічається вкрай рідко. Прослідковується прямий зв'язок між захворюваністю та віком пацієнтів. За показниками виявлення неоплазій за останні роки спостерігається тенденція до "омолодження" раку.

3. Проведено забір матеріалу для морфологічного дослідження та сформовано задачі оптимізації забору крові пацієнтів з неоплазіями з їх зберіганням у холодильній установці.

4. 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, ALK1 та EGFR 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 EGFR з кращими результатами лікування препаратами першої лінії.

5. 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.

6. Інвазивний рак неспецифічного типу характеризується дуже варіабельними особливостями як паренхіматозного компоненту, так і їх строми. Ступінь диференціювання пухлин, наявність патологічної біомінералізації та інтенсивність вираженості імунної реакції у пухлинному мікрооточенні впливають на перебіг злякисного процесу та його розповсюдження. При імуногістохімічному дослідженні виявлено, що тканина інвазивного раку неспецифічного типу у 78% випадків має експресію EP, у 62% – PR, у 20% – HER2/neu, у 40% – p53, у 56% – bcl-2, 57,5% – MMP1, у 70% – VEGF, у 80% – шаперону 90α. Крім того неопласична тканина проявляє різний ступінь проліферативної активності та неоваскуляризації, а також варіабельний склад імунного мікрооточення. Імунопрофіль пухлини залежить як від експресії окремих білків у пухлинній тканині, так і від ступеню диференціювання пухлин та якісних характеристик імунного мікрооточення.

7. Використання неінвазивного дослідження (рідинної біопсії) РІКЗСА-мутантної цпДНК при місцево-поширеному РМЗ може надати важливу інформацію про динаміку злякисного процесу і допомогти оцінити відповідь на лікування у таких пацієнтів. Так, встановлено кількісні показники меж цпДНК у плазми крові пацієнтів, які відповідають кожному окремому

імунофенотипу пухлини. Так, доведено, що для PIK3CA-мутантного РМЗ характерними є ER-позитивні і Her2 / neu-негативні фенотипи пухлини МЗ. Динаміка змін кількості PIK3CA-мутантної цпДНК в серійних зразках плазми, що досліджується за допомогою цифрової ПЛР, відображає пухлинне навантаження і відповідь на лікування. Вивчення кількісного складу генних мутацій у зразках крові та тканинах неоплазії основних локалізацій довело ефективність використання технології «liquid biopsy», що дозволяє підібрати адекватну лікувальну тактику у кожному окремому випадку.

8. 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 сохрога amylose. Експресія білка теплового шоку Hsp70 не залежала від присутності інтралюмінальних включень та ступеню диференціювання пухлини.

9. 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).

10. 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.

11. Використання комплексного морфологічного (гістологічного та імуногістохімічного) дослідження перед- та післяопераційного матеріалу

дозволяє оцінити ступінь злоякісності та поширеності пухлинного процесу. Завдяки цьому, нами здійснено опис плану молекулярно-генетичних досліджень та запропоновано сучасну скринінгову панель визначення імуногістохімічних маркерів у злоякісних новоутвореннях найпоширеніших локаліацій.

12. Встановлено статистичну залежність між експресією специфічних рецепторів до відповідних імуногістохімічних маркерів з цифровими результатами, отриманими за допомогою цифрової полімеразної ланцюгової реакції крові та пухлинної тканини. Комплексний аналіз отриманих результатів дозволив теоретично обґрунтувати особливості кількісного складу вщДНК та характер варіацій імунофенотипу пухлин до лікування та після, що дозволяє прогнозувати поведінку злоякісної пухлини в залежності від даних виключно рідинної біопсії.

13. Сформована база результатів значно поглиблює розуміння поведінки пухлин органів основних локаліацій та пропонується до використання у клінічній практиці онкологів і патологів для формування локальних рекомендацій до протоколів діагностики та лікувальних схем.

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 Sep10; 36: 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. Sikora V, Romaniuk A, Lyndin M, Smiyan O, Romaniuk O, Moskalenko R, Hyriavenko N, Karpenko L. Features of the hidden immunodeficiency in a newborn baby whose mother suffered from leukemia. *Virchows Archiv.* 2018;473(Suppl 1):149.

23. Moskalenko R, Danilchenko S, Piddubnyi A. et al. Morphological and Crystal Chemical Characteristics of Gallbladder Biomineralization. *Acta Facultatis Medicae Naissensis* 37(2):139-148. DOI: 10.5937/afmnai2002139M

24. Vynnychenko I, Kononenko M, Smorodska O, Ivanov S, Moskalenko Y, Vynnychenko O, Sikora V, Lyndin M, Romaniuk A. Case report of giant nonmetastatic gastrointestinal solid tumor without clinical manifestations in a middle-aged male patient. *Novosti Khirurgii.* 2020;28(5):597-602. DOI: 10.18484/2305-0047.2020.5.597.

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. Haybaeck J. Mechanism of molecular Carcinogenesis, Volume 2 / Johannes Haybaeck. – Springer, 2017. – 343 p.

28. Федянин М.Ю., Полянская Е.М., Тюляндин С.А. Роль циркулирующей в крови опухолевой ДНК при раке толстой кишки / М.Ю. Федянин, Е.М. Полянская, С.А. Тюляндин // Онкологическая колопроктология. – 2016. – Т. 6, № 3. – С. 43-52.

29. Alix-Panabieres C., Pantel K. Clinical Applications of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA as Liquid Biopsy / C. Alix-Panabieres, K. Pantel // *Cancer Discovery*. – 2016. – 6(5). – P. 479-491.

30. Жуков Н.В., Зарецкий А.Р., Лукьянов С.А. Исследование циркулирующей опухолевой ДНК (жидкая биопсия). Перспективы использования в онкологии / Н.В.Жуков, А.Р. Зарецкий, С.А. Лукьянов // *Онкогематология*. – 2014. – №4. – С.28-36

31. Alamgeer M., Ganju V., Watkins D.N. Novel therapeutic targets in non-small cell lung cancer / M. Alamgeer, V. Ganju, D.N. Watkins // *Curr. Opin. Pharmacol.* – 2013. – 13. – P. 394–401.

32. Kang Y, Pantel K. Tumor cell dissemination: emerging biological insights from animal models and cancer patients / Y Kang, K Pantel // *Cancer Cell*. – 2013. – 23. – P. 573–581.

33. Sorber L., et al. Circulating cell-free nucleic acids and platelets as a liquid biopsy in the provision of personalized therapy for lung cancer patients. *Lung Cancer*. – 2016, <http://dx.doi.org/10.1016/j.lungcan.2016.04.026>

34. Murtaza M, Dawson SJ, Tsui DW, Gale D, Forsheo T, Piskorz AM, et al. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA / M Murtaza, SJ Dawson, DW Tsui, D Gale, T Forsheo, AM Piskorz, et al. // *Nature*. – 2013. – 497. – P. 108–112.

35. Heitzer E, Ulz P, Geigl JB. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer / E Heitzer, P Ulz, JB Geigl // *Clin Chem*. – 2015. – 61. – P. 112–123.

36. Newman AM, Bratman SV, To J, Wynne JF, Eclov NC, Modlin LA, et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage / AM Newman, SV Bratman, J To, JF Wynne, NC Eclov, LA Modlin, et al. // *Nat Med*. – 2014. – 20: 548–54.

37. Yong E. Cancer biomarkers: written in blood / E. Yong // *Nature*. – 2014. – 511. – P. 524–6.

38. Винниченко І.О., Привалова А.О., Смородська О.М., Винниченко О.І., Москаленко Ю.В. Рідинна біопсія: перспективи застосування в онкології (огляд літератури). *Art of Medicine*. 2018;1(5):85-91.

39. Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies / C Bettegowda, M Sausen, RJ Leary, I Kinde, Y Wang, N Agrawal, et al. // *Sci Transl Med*. – 2014. – 6. – P. 224.

40. Nair M, Sandhu SS, Sharma AK. Cancer molecular markers: A guide to cancer detection and management. *Semin Cancer Biol*. 2018 Oct;52(Pt 1):39-55. doi: 10.1016/j.semcancer.2018.02.002.

41. Jemal A1, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward et al. .Global cancer statistics, *A Cancer J Clin*. 2011;61:69–90.

42. Malvezzi M, Bertuccio P, Rosso T, Rota M, Levi F et al. 2015: does lung cancer have the highest death rate in EU women? *Ann Oncol*. 2015;26(4):779–86.

43. Malvezzi M, Bertuccio P, Levi F, La Vecchia C, Negri E. European cancer mortality predictions for the year 2013. *Ann Oncol*. 2013;24:792–800.

44. Malvezzi M, Bertuccio P, Levi F, La Vecchia C, Negri E. European cancer mortality predictions for the year 2014. *Ann Oncol* 2014;25:1650–1656.

45. Malvezzi M, Bertuccio P, Rosso T, Rota M, Levi F et al. 2015: does lung cancer have the highest death rate in EU women? *Ann Oncol*. 2015;26(4):779–86.

46. Lortet-Tieulent J, Renteria E, Sharp L, Weiderpass E, Comber H. et al. Convergence of decreasing male and increasing female incidence rates in major tobacco-related cancers in Europe in 1988–2010. *Eur J Cancer*. 2015;51(9):1144–63.

47. [Cancer in Ukraine,2012-2013]Ukrainian cancer registry statistics: Bulletin of national cancer registry of Ukraine–2014.– 15.

48. [Cancer in Ukraine,2013-2014]Ukrainian cancer registry statistics: Bulletin of national cancer registry of Ukraine–2015.– 16.

49. [Cancer in Ukraine,2014-2015]Ukrainian cancer registry statistics: Bulletin of national cancer registry of Ukraine–2016.– 17.

50. [Cancer in Ukraine,2015-2016]Ukrainian cancer registry statistics: Bulletin of national cancer registry of Ukraine–2017.– 18.

51. Винниченко І.О., Москаленко Ю.В., Тарасенко С.В., Винниченко О.І., Пустовгар Л.Г., Смородська О.М., Сердюк М.Ю. Аналіз поширеності раку легенів серед жінок сумської області. J. Clin. Exp. Med. Res., 2017;5(3):881–90.

52. Винниченко І.О., Москаленко Ю.В., Сердюк М.Ю., Винниченко О.І. Особливості диференціальної діагностики доброякісних пухлин легень та її значення для вибору хірургічної тактики. Клінічна хірургія. 2018;85(4):67–70.

53. Tavassoli F. A. 3. Tumor of the Breast and female genital organs. World Health Organization Classification of Tumours / F. A. Tavassoli, P. Devilee. – Lyon: IARC Press, 2003. – 432 p.

54. Breast cancer before age 40 years / [C. K. Anders, R. Johnson, J. Litton at all.]. // Semin Oncol. – 2009. – №3. – P. 237-249.

55. Линдін М.С., Романюк А.М. Інвазивний рак неспецифічного типу молочної залози: гістологічні та імуногістохімічні особливості / Challenges of medical science and education: an experience of EU countries and practical introduction in Ukraine : Collective monograph. – Riga: Izdevnieciba “Baltija Publishing”, 2020. – С. 264–281.

56. Brusovtsov D, Lyndin M, Sikora V, Hyriavenko N, Romaniuk A. Research on the incidence of malignant testicular tumors in Ukraine and Sumy region. Eastern Ukrainian Medical Journal. 2020;8(2):145-152.

57. Fedorenko ZP, Mykhailovych YuI, Hulak LO. Rak v Ukraini, 2018-2019. Biuleten natsionalnoho kantser-reiestru Ukrainy. 2020;21:60-1. [in Ukrainian].

58. Reid BM, Permuth JB, Sellers TA. Epidemiology of ovarian cancer: a review. Cancer Biol Med. 2017 Feb;14(1):9-32.

59. Oberaigner W, Minicozzi P, Bielska-Lasota M, Allemani C, de Angelis R, Mangone L, Sant M. Eurocare Working Group. Survival for ovarian cancer in

Europe: the across-country variation did not shrink in the past decade. *Acta Oncol.* 2012 Apr;51(4):441-53.

60. Vo C, Carney ME. Ovarian cancer hormonal and environmental risk effect. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2007 Dec;34(4):687-700.

61. Budiana ING, Angelina M, Pemayun TGA. Ovarian cancer: Pathogenesis and current recommendations for prophylactic surgery. *J Turk Ger Gynecol Assoc.* 2019 Feb 26;20(1):47-54.

62. Momenimovahed Z, Tiznobaik A, Taheri S, Salehiniya H. Ovarian cancer in the world: epidemiology and risk factors. *Int J Womens Health.* 2019;11:287-99.

63. Brett M Reid, Jennifer B Permeth, Thomas A Sellers. Epidemiology of ovarian cancer: a review. *Cancer Biol Med.* 2017 Feb;14(1):9-32.

64. Чижма РА, Біденко МВ, Николенко АП, Піддубний АМ, Москаленко РА. Патологічна біомінералізація при пухлинах яєчників. *Вістник проблем біології і медицини.* 2020; 4(158):43-48. DOI: 10.29254/2077-4214-2020-4-158-43-48

65. Линдін МС, Кравцова ОІ, Карпенко ЛІ, Панченко ВД, Романюк АМ. Дослідження епідеміологічних та морфологічних особливостей злоякісних пухлин тіла матки. *Art of medicine.* 2018;3(7): 66-71. <http://art-of-medicine.ifnmu.edu.ua/index.php/aom/article/view/104>

66. Романюк АМ, Гирявенко НІ, Линдін МС, Сікора ВВ. Первинний рак маткових труб : монографія. – Суми : Сумський державний університет, 2019. – 110 с.

67. Heintz A. P., Odicino F., Maisonneuve P., Quinn M. A., Benedet J. L., Creasman W. T., Ngan H. Y., Pecorelli S., Beller U. Carcinoma of the fallopian tube. FIGO 26th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer. *Int J Gynaecol Obstet.* 2006; 95 Suppl 1: S145–60.

68. Obermair A., Taylor K. H., Janda M., Nicklin J. L., Crandon A. J., Perrin L. Primary fallopian tube carcinoma: the Queensland experience. *Int J Gynecol Cancer.* 2001 Jan-Feb;11(1):69–72.

69. Klein M., Rosen A. C., Lahousen M., Graf A. H., Rainer A. Lymphadenectomy in primary carcinoma of the Fallopian tube. *Cancer Lett.* 1999 Dec 1;147(1-2):63–6.

70. Ajithkumar T. V., Minimole A. L., John M. M., Ashokkumar O. S. Primary fallopian tube carcinoma. *Obstet Gynecol Surv*, 2005, 60(4):247–252.

71. Kosary C., Trimble E. L. Treatment and survival for women with Fallopian tube carcinoma: a population-based study. *Gynecol Oncol.* 2002 Aug;86(2):190–1.

72. Baekelandt M., Jorunn Nesbakken A., Kristnsen G. B, Tropé C. G., Abeler V. M. Carcinoma of the fallopian tube. *Cancer* 2000;89:2076–84.

73. Kosary C., Trimble E. L. Treatment and survival for women with Fallopian tube carcinoma: a population-based study. *Gynecol Oncol.* 2002 Aug;86(2):190–1.

74. Bristow R. E., Tomacruz R. S., Armstrong D. K., Trimble E. L., Montz F. J. Survival effect of maximal cytoreductive surgery for advanced ovarian carcinoma during the platinum era: a meta-analysis. *J Clin Oncol.* 2002 Mar 1;20(5):1248–59.

75. Albalat R., Jiménez J., Márquez F., Lizarralde C. Carcinoma de las trompas de Falopio. *Clin Invest Ginecol Obstet.* 2012;39: 86–8.

76. Сумцов Г. А. Сумцов Д. Г. Первичный рак маточных труб. Сумы : Сумский государственный университет, 2015.

77. . Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin.* 2016; 66(1):7-30.

78. . Мурзин Я.Ю. Современные аспекты инвазивной диагностики очаговых образований лёгких: автореф. Дис. канд. мед. наук. Москва. 2012. 28с.

79. 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.

80. . Bagheri R, Haghzi 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

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

82. 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.

83. 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/>

84. 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.

85. 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

86. 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

87. Korpanty G.J. Biomarkers That Currently Affect Clinical Practice in Lung Cancer: EGFR, ALK, MET, ROS-1, and KRAS / G.J. Korpanty, D.M. Graham, M.D. Vincent, N.B. Leighl // *Frontiers in oncology*. – 2014. – 4. – P. 204.

88. Москаленко ЮВ, Винниченко ІО, Смородська ОМ, Винниченко ОІ, Москаленко РА. PD-L1 тестування як спосіб персоналізації лікування недрібноклітинного раку легень. *Лікарська справа*. 2019;4:40-45. DOI 10.31640/JVD.5-6.2019(4).

89. Tan DS, Yom SS, Tsao MS, et al. The International Association for the Study of Lung Cancer consensus statement on optimizing management of EGFR mutation-positive non-small cell Lung cancer: Status in 2016. *J Thorac Oncol.* 2016;11(7):946-963.

90. Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB, et al. Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and association for Molecular Pathology. *J Thorac Oncol.* 2013;8(7):823-859.

91. Sznol M, Chen L. Antagonist antibodies to PD-1 and B7-H1 (PD-L1) in the treatment of advanced human cancer. *Clin Cancer Res.* 2013;19(19):1021-1034.

92. Tsao MS, Nicholson AG, Hirsch FR. Implementation of PD-L1 testing for personalized therapy for lung cancer. *IASLC Atlas of PD-L1 immunohistochemistry testing in lung cancer.* 2017:109-113.

93. Garon EB, Rizvi NA, Hui R, et al. KEYNOTE-001 Investigators. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2015;372(21):2018-2028.

94. Hui R, Gandhi L, Costa EC, et al. Long-term OS for patients with advanced NSCLC enrolled in the KEYNOTE-001 study of pembrolizumab (pembro). *J Clin Oncol.* 2016;34(15_suppl):abstr 9026.

95. Reck M, Rodriguez-Abreu D, Robinson AG, et al. KEYNOTE-024 Investigators. Pembrolizumab versus chemotherapy for PD-L1-positive non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2016;375(19):1823-1833.

96. Büttner R, Gosney JR, Skov BG, et al. Programmed Death-Ligand 1 Immunohistochemistry Testing: A Review of Analytical Assays and Clinical Implementation in Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol.* 2017;35(34):3867-3876.

97. Винниченко ІО, Москаленко ЮВ, Винниченко ОІ, Москаленко РА, Піддубний АМ. Бульозний пемфігоїд Лєвера у хворого на метастатичний рак

легені після лікування атезолізумабом. Клінічна онкологія. 2019;9(1):1–3. DOI 10.32471/clinicaloncology.2663-466X.38.22146.

98. Mok TSK, Wu YL, Kudaba I, Kowalski DM, Cho BC, Turna HZ, Castro G Jr, Srimuninnimit V, Laktionov KK, Bondarenko I, Vynnychenko I. et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for previously untreated, PD-L1-expressing, locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-042): a randomised, open-label, controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 2019 May 4;393(10183):1819-30. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)32409-7.

99. Jotte R, Cappuzzo F, Vynnychenko I, Stroyakovskiy D, Rodríguez-Abreu D, Hussein M, Soo R, Conter HJ, Kozuki T, Huang KC, Graupner V, Sun SW, Hoang T, Jessop H, McClelland M, Ballinger M, Sandler A, Socinski MA. Atezolizumab in Combination With Carboplatin and Nab-Paclitaxel in Advanced Squamous NSCLC (IMpower131): Results From a Randomized Phase III Trial. *J Thorac Oncol*. 2020 Aug;15(8):1351-60. DOI: 10.1016/j.jtho.2020.03.028.

100. Garassino M, Vanteenkiste JF, Kim JH, et al. Durvalumab in >3rd-line locally advanced or metastatic, EGFR/ALK wild-type NSCLC: results from the phase 2 ATLANTIC study. Presented at World Conference on Lung Cancer; December 7, 2016; Vienna, Austria.

101. Verschraegen CF, Chen F, Spigel DR, et al. Avelumab (MSB0010718C; anti-PD-L1) as a first-line treatment for patients with advanced NSCLC from the JAVELIN solid tumor phase 1b trial: safety, clinical activity, and PD-L1 expression. *J Clin Oncol*. 2016;34(suppl):abstr 9036.

102. Antonia SJ, Lopez-Martin JA, Bendell J, et al. Nivolumab alone and Nivolumab plus ipilimumab in recurrent small-cell lung cancer (CheckMate 032): a multicentre, open-label, phase 1/2 trial. *Lancet Oncol*. 2016;17(7):883-895.

103. Antonia S, Goldberg SB, Balmanoukian A, et al. Safety and antitumour activity of durvalumab plus tremilimumab in non-small-cell lung cancer: multicentre, phase 1b study. *Lancet Oncol*. 2016;17(3):299-308.

104. Oronsky B, Reid TR, Oronsky A, Carter CA. What's new in SCLC? A review. *Neoplasia* 2017; 19: 842–47.

105. Wang S, Tang J, Sun T, et al. Survival changes in patients with small cell lung cancer and disparities between different sexes, socioeconomic statuses and ages. *Sci Rep* 2017; 7: 1339.

106. Byers LA, Rudin CM. Small cell lung cancer: where do we go from here? *Cancer* 2015; 121: 664–72.

107. Pietanza MC, Byers LA, Minna JD, Rudin CM. Small cell lung cancer: will recent progress lead to improved outcomes? *Clin Cancer Res* 2015; 21: 2244–55.

108. Früh M, De Ruyscher D, Popat S, Crinò L, Peters S, Felip E. Small-cell lung cancer (SCLC): ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2013; 24 (suppl 6): vi99–105.

109. Rudin CM, Ismaila N, Hann CL, et al. Treatment of small-cell lung cancer: American Society of Clinical Oncology endorsement of the American College of Chest Physicians guideline. *J Clin Oncol* 2015; 33: 4106–11.

110. Japan Lung Cancer Society. Lung cancer clinical practice guidelines 2018 version III. Small cell lung cancer (in Japanese). <https://www.haigan.gr.jp/guideline/2018/1/3/180103020100.html> (accessed Aug 2, 2019).

111. Farago AF, Keane FK. Current standards for clinical management of small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res* 2018; 7: 69–79.

112. Fukuoka M, Furuse K, Saijo N, et al. Randomized trial of cyclophosphamide, doxorubicin, and vincristine versus cisplatin and etoposide versus alternation of these regimens in small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83: 855–61.

113. Rossi A, Di Maio M, Chiodini P, et al. Carboplatin- or cisplatin-based chemotherapy in first-line treatment of small-cell lung cancer: the COCIS meta-analysis of individual patient data. *J Clin Oncol* 2012; 30: 1692–98.

114. Horita N, Yamamoto M, Sato T, et al. Topotecan for relapsed small-cell lung cancer: systematic review and meta-analysis of 1347 patients. *Sci Rep* 2015; 5: 15437.

115. Horn L, Mansfield AS, Szczęśna A, et al. First-line atezolizumab plus chemotherapy in extensive-stage small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2018; 379: 2220–29.
116. Stewart R, Morrow M, Hammond SA, et al. Identification and characterization of MEDI4736, an antagonistic anti-PD-L1 monoclonal antibody. *Cancer Immunol Res* 2015; 3: 1052–62.
117. AstraZeneca. Imfinzi (durvalumab) prescribing information. August, 2019. <https://www.azpicentral.com/imfinzi/imfinzi.pdf#page=1> (accessed Aug 2, 2019).
118. AstraZeneca. Imfinzi (durvalumab) summary of product characteristics. September, 2018. <https://www.medicines.org.uk/emc/product/9495/smpc> (accessed Aug 2, 2019).
119. Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, et al. Durvalumab after chemoradiotherapy in stage III non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2017; 377: 1919–29.
120. Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, et al. Overall survival with durvalumab after chemoradiotherapy in stage III NSCLC. *N Engl J Med* 2018; 379: 2342–50.
121. Cho DC, Mahipal A, Dowlati A, et al. Safety and clinical activity of durvalumab in combination with tremelimumab in extensive disease small-cell lung cancer (ED-SCLC). *Proc Am Soc Clin Oncol* 2018; 36 (suppl): abstr 8517.
122. Goldman JW, Dowlati A, Antonia SJ, et al. Safety and antitumor activity of durvalumab monotherapy in patients with pretreated extensive disease small-cell lung cancer (ED-SCLC). *Proc Am Soc Clin Oncol* 2018; 36 (suppl): abstr 8518.
123. Bondarenko I, Juan-Vidal O, Pajkos G, et al. Preliminary efficacy of durvalumab plus tremelimumab in platinum-refractory/resistant ED-SCLC from arm A of the phase II BALTIC study. *Ann Oncol* 2018; 29 (suppl 8): viii596–602 (abstr).

124. Paz-Ares L, Dvorkin M, Chen Y, et al. Durvalumab plus platinum-etoposide versus platinum-etoposide in first-line treatment of extensive-stage small-cell lung cancer (CASPIAN): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 2019;394(10212):1929-1939. doi:10.1016/S0140-6736(19)32222-6

125. Garon EB, Hellmann MD, Rizvi NA, et al. Five-year overall survival for patients with advanced non-small-cell lung cancer treated with pembrolizumab: results from the phase I KEYNOTE-001 study. *J Clin Oncol* 2019; 37: 2518–27

126. Gray JE, Villegas AE, Daniel DB, et al. Three-year overall survival update from the PACIFIC trial. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2019; 37 (suppl): abstr 8526.

127. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, et al. Five-year survival and correlates among patients with advanced melanoma, renal cell carcinoma, or non-small cell lung cancer treated with nivolumab. *JAMA Oncol* 2019; published online July 25. DOI:10.1001/jamaoncol.2019.2187.

128. Slotman B, Faivre-Finn C, Kramer G, et al. Prophylactic cranial irradiation in extensive small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2007; 357: 664–72.

129. Takahashi T, Yamanaka T, Seto T, et al. Prophylactic cranial irradiation versus observation in patients with extensive-disease small-cell lung cancer: a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2017; 18: 663–71.

130. Nosaki K, Seto T, Shimokawa M, Takahashi T, Yamamoto N. Is prophylactic cranial irradiation (PCI) needed in patients with extensive-stage small cell lung cancer showing complete response to first-line chemotherapy? *Radiother Oncol* 2018; 127: 344–48.

131. Antonia SJ, Balmanoukian A, Brahmer J, et al. Clinical activity, tolerability, and long-term follow-up of durvalumab in patients with advanced NSCLC. *J Thorac Oncol* 2019; 14: 1794–806.

132. Ramalingam SS, Vansteenkiste J, Planchard D, ... Vynnychenko I ... Overall Survival with Osimertinib in Untreated, EGFR-Mutated Advanced NSCLC. *N Engl J Med*. 2020 Jan 2;382(1):41-50. DOI: 10.1056/NEJMoa1913662.

133. Hanna N, Johnson D, Temin S, et al. Systemic therapy for stage IV non-small-cell lung cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. *J Clin Oncol* 2017;35:3484-515.

134. Planchard D, Popat S, Kerr K, et al. Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2018;29:Suppl 4:iv192-iv237.

135. Wu YL, Planchard D, Lu S, et al. PanAsian adapted clinical practice guidelines for the management of patients with metastatic non-small-cell lung cancer: a CSCOESMO initiative endorsed by JSMO, KSMO, MOS, SSO and TOS. *Ann Oncol* 2019;30: 171-210.

136. Clinical practice guidelines in oncology: NCCN guidelines for non-small cell lung cancer V.7. Fort Washington, PA: National Comprehensive Cancer Network, 2019 (<https://www.nccn.org>).

137. Cross DA, Ashton SE, Ghiorghiu S, et al. AZD9291, an irreversible EGFR TKI, overcomes T790M-mediated resistance to EGFR inhibitors in lung cancer. *Cancer Discov* 2014;4:1046-61.

138. Reungwetwattana T, Nakagawa K, Cho BC, et al. CNS response to osimertinib versus standard epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in patients with untreated EGFR-mutated advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2018;36:JCO2018783118.

139. Soria J-C, Ohe Y, Vansteenkiste J, et al. Osimertinib in untreated EGFR-mutated advanced non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2018;378:113-25.

140. Tagrisso (osimertinib): summary of product characteristics. London: European Medicines Agency, 2018 (https://www.ema.europa.eu/documents/product-information/tagrisso-epar-product-information_en.pdf).

141. Tagrisso (osimertinib): highlights of prescribing information. Silver Spring, MD: Food and Drug Administration, 2018 (https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/208065s0081bl.pdf).

142. Berry G, Kitchin RM, Mock PA. A comparison of two simple hazard ratio estimators based on the log-rank test. *Stat Med* 1991;10:749-55.

143. Ellis PM, Shepherd FA, Millward M, et al. Dacomitinib compared with placebo in pretreated patients with advanced or metastatic non-small-cell lung cancer (NCIC CTG BR.26): a double-blind, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2014;15:1379-88.

144. Miller VA, Hirsh V, Cadranel J, et al. Afatinib versus placebo for patients with advanced, metastatic non-small-cell lung cancer after failure of erlotinib, gefitinib, or both, and one or two lines of chemotherapy (LUX-Lung 1): a phase 2b/3 randomised trial. *Lancet Oncol* 2012;13:528- 38.

145. Mok TS, Wu Y-L, Thongprasert S, et al. Gefitinib or carboplatin–paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2009;361:947-57.

146. Rosell R, Carcereny E, Gervais R, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2012;13:239-46.

147. Yang JC, Wu YL, Schuler M, et al. Afatinib versus cisplatin-based chemotherapy for EGFR mutation-positive lung adenocarcinoma (LUX-Lung 3 and LUX-Lung 6): analysis of overall survival data from two randomised, phase 3 trials. *Lancet Oncol* 2015;16:141-51.

148. Yang JJ, Zhou Q, Yan HH, et al. A phase III randomised controlled trial of erlotinib vs gefitinib in advanced nonsmall cell lung cancer with EGFR mutations. *Br J Cancer* 2017;116:568-74.

149. Paz-Ares L, Tan EH, O’Byrne K, et al. Afatinib versus gefitinib in patients with EGFR mutation-positive advanced nonsmall-cell lung cancer: overall survival data from the phase IIb LUX-Lung 7 trial. *Ann Oncol* 2017;28:270-7.

150. Mok TS, Cheng Y, Zhou X, et al. Improvement in overall survival in a randomized study that compared dacomitinib with gefitinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer and EGFRactivating mutations. *J Clin Oncol* 2018; 36:2244-50.

151. Wang Z-F, Ren S-X, Li W, Gao G-H. Frequency of the acquired resistant mutation T790 M in non-small cell lung cancer patients with active exon 19Del and exon 21 L858R: a systematic review and metaanalysis. *BMC Cancer* 2018;18:148.

152. John T, Akamatsu H, Delmonte A, et al. EGFR mutation analysis for prospective patient selection in AURA3 phase III trial of osimertinib versus platinumpemetrexed in patients with EGFR T790M-positive advanced non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer* 2018;126:133-8.

153. Roeper J, Falk M, Tiemann M, et al. Risk of not receiving 2nd line therapy is high in EGFR mt+ pts: real world data of certified lung cancer centers on treatment sequence in EGFR mt+ pts. *J Thorac Oncol* 2018;13:Suppl:S94-S95. abstract.

154. Gray JE, Thakrar B, Sun P, Maclachlan S, Chehab N, Potter D. Treatment (tx) patterns in patients (pts) with lung cancer starting 1st or 2nd generation (1G/2G) EGFR-TKI: a US insurance claims database analysis. *Ann Oncol* 2018;29:Suppl 9:mdy425.020. abstract.

155. Chiang A, Fernandes A, Pavilack M, et al. Real world biomarker testing and treatment patterns in patients with advanced NSCLC receiving EGFR-TKIs. *J Thorac Oncol* 2018;13:Suppl:S410-S111. abstract.

156. Rangachari D, Yamaguchi N, VanderLaan PA, et al. Brain metastases in patients with EGFR-mutated or ALK-rearranged non-small-cell lung cancers. *Lung Cancer* 2015;88:108-11.

157. Ramalingam SS, Cheng Y, Zhou C, et al. Mechanisms of acquired resistance to first-line osimertinib: preliminary data from the phase III FLAURA study. Presented at the European Society for Medical Oncology (ESMO) 2018 Congress, Munich, Germany, October 19–23, 2018.

158. Hofman P, Popper HH. Pathologists and liquid biopsies: to be or not to be? *Virchows Arch.* 2016;469(6):601–9. DOI:10.1007/s00428-016-2004-z

159. Ma F, Zhu W, Guan Y, et al. ctDNA dynamics: a novel indicator to track resistance in metastatic breast cancer treated with anti-HER2 therapy. *Oncotarget*. 2016;7(40):66020–31. DOI:10.18632/oncotarget.11791

160. Diaz LA Jr, Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol*. 2014;32(6):579–86. DOI:10.1200/JCO.2012.45.2011

161 Gormally E, Caboux E, Vineis P, et al. Circulating free DNA in plasma or serum as biomarker of carcinogenesis: practical aspects and biological significance. *Mutation research*. 2007;635(2-3):105–17. DOI:10.1016/j.mrrev.2006.11.002

162. Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nature reviews. Cancer*. 2011;11(6):426–37. DOI: 10.1038/nrc3066

163. Привалова А.О., Винниченко І.О., Гарбузова В.Ю., Винниченко О.І., Москаленко Ю.В. Роль мутацій гена PIK3CA в розвитку раку грудної залози (огляд літератури). *Запорізький медичний журнал*. 2020;22-4(121):554-60.

164. Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018. Press release N263, 12 Sep 2018. Retrieved from <https://www.who.int/>.

165. Федоренко З.П., Михайлович Ю.Й., Гулак Л.О., Горох Є.Л., Рижов А.Ю., Сумкіна О.В., Куценко Л.Б. Бюлетень Національного канцер-реєстру України № 20, 2019. Київ. Отримано з <http://ncru.inf.ua>.

166. Цуканов К. Ю., Красненко А. Ю., Коростин Д. О., Чуров А. В., Стеценко И. Ф., Плотников Н. А., и др. Рак молочной железы: анализ спектра соматических драйверных мутаций с применением высокопроизводительного секвенирования. *Вестник РМГУ*. 2017. №6, С. 52-58.

167. Gkeka P., Evangelidis T., Pavlaki M., Lazani V., Christoforidis S., et al. Investigating the structure and dynamics of the PIK3CA wild-Type and

H1047R oncogenic Mutant. PLoS Comput Biol, 2014. 10(10): e1003895. doi: 10.1371/journal.pcbi.1003895

168. Филипенко М.Л., Шамовская Д.В., Оськина Н.А., Оскорбин И.П., Храпов Е.А., Овчинникова Л.К. и др. Разработка метода выявления соматических мутаций гена PIK3CA с помощью мультиплексной аллель-специфичной ПЦР в режиме реального времени и его валидация в опухолях больных раком молочной железы. Альманах клинической медицины. 2015. №41. С. 12-18. doi: 10.18786/2072-0505-2015-41-12-18.

169. Karakas, B., Bachman, K.E. and Park, B.H. Mutation of the PIK3CA oncogene in human cancers. British Journal of Cancer. 2006. 94(4), p. 455-459.

170. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Yan H, et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. Science, 2004. 304(5670):554.

171. Mukohara T. PI3K mutations in breast cancer: prognostic and therapeutic implications. Breast Cancer: Targets and Therapy, 2015. 15(7), 111-23. doi: 10.2147/BCTT

172. Dumont A.G., Dumont S.N., Trent J.C. The favorable impact of PIK3CA mutations on survival: an analysis of 2587 patients with breast cancer. Chin J Cancer. 2012. 31(7), 327-34. doi: 10.5732/cjc.012.10032.

173. Остапченко Л.І., Синельник Т.Б., Компанець І.В. Біологічні мембрани та основи внутрішньоклітинної сигналізації. Теоретичні аспекти: навч. посібник. Київ, 2016. 639с.

174. Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. Nat Rev Drug Discov. 2009. 8(8), 627–644.

175. Fabrice Andre, Eva Ciruelos, Gabor Rubovszky, Mario Campone, Sibylle Loibl, Hope S. Rugo, et al. Alpelisib for PIK3CA-mutated, hormone receptor–positive advanced breast cancer. N Engl J Med. 2019. 380(20):1929-1940. doi: 10.1056/NEJMoa1813904

176. Volinia S, Hiles I, Ormondroyd E, Nizetic D, Antonacci R, Rocchi M, Waterfield MO. Molecular cloning, cDNA sequence, and chromosomal

localization of the human phosphatidylinositol 3-kinase p110[alpha] (PIK3CA) Gene. *Genomics*, 1994. No 24. P. 472 – 477.

177. GenAtlas. PIK3CA, phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide (3q26.32). 2015. Retrieved from <http://www.genatlas.org>.

178. Cantley LC. The Phosphoinositide 3-Kinase Pathway. *Science*, 2002, 296(5573), 1655–1657.

179. Lee J.W., Soung Y.H., Kim S.Y., Lee H.W., Park W.S., et al. PIK3CA gene is frequently mutated in breast carcinomas and hepatocellular carcinomas. *Oncogene*, 2005. 24(8). P. 1477–1480.

180. Luo J, Manning BD and Cantley LC. Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise. *Cancer Cell*, 2003. 4(4), 257–262.

181. База знаний по биологии человека. PI3K: общие сведения. Получено с <http://humbio.ru/>.

182. Kato S, Iida S, Higuchi T, et al. PIK3CA mutation is predictive of poor survival in patients with colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2007. No 121. P. 1771–8.

183. Kozaki K, Imoto I, Pimkhaokham A, Hasegawa S, Tsuda H, Omura K, Inazawa J. PIK3CA mutation is an oncogenic aberration at advanced stages of oral squamous cell carcinoma. *Cancer Sci*, 2006. 97(12). P.1351-1358.

184. Kumar A., Rajendran V., Sethumadhavan R., Purohit R. AKT kinase pathway: a leading target in cancer research. *Scientific World J*. 2013. 756134, 6p. doi: 10.1155/2013/756134

185. Koboldt, D.C., Fulton, R.S., McLellan, M.D., Schmidt, H., Kalicki-Veizer, J., McMichael, J.F., et al. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2012. 490(7418), P. 61-70

186. Chopra N, Turner NC. Targeting PIK3CA-mutant advanced breast cancer in the clinical setting. *Lancet Oncol*. 2017; 18(7): 842-843. doi: 10.1016/S1470-2045(17)30430-8.

187. Kodahl A.R., Ehmsen S., Pallisgaard N., Jylling A.M., Jensen J.D., et al. Correlation between circulating cell-free PIK3CA tumor DNA levels and

treatment response in patients with PIK3CA-mutated metastatic breast cancer. *Mol. Oncol.* 2018. 12(6). P.925-935. doi: 10.1002/1878-0261.12305

188. Courtney KD, Corcoran RB, Engelman JA. The PI3K pathway as drug target in human cancer. *J Clin Oncol.*2010. No 28, P. 1075–1083.

189. Zhao, W., Qiu, Y. and Kong, D. Class I phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors for cancer therapy. *Acta Pharm Sin B.* 2017. Vol. 7, No1. P. 27-37.

190. Kolomiets O., Yazykov O., Lukavenko I., Andriushchenko V., Romaniuk A., Moskalenko R. The existence of calcifications in breast cancer tissue doesn't affect expression of HER2-neu protein. *Virchows Archiv.* 2020. – 447 (Suppl 1): S 226.

191. Sikora V, Lyndin M, Hyriavenko N, Moskalenko R, Piddubnyi A, Karpenko L, Romaniuk A. Expressed cartilaginous and osseous metaplasia in breast cancer: histological and immunohistochemical aspects. *Virchows Archiv.* 2019. – 449 (Suppl 1): S 91.

192. Juric D, Krop I, Ramanathan RK, et al. Phase I dose-escalation study of taselisib, an oral PI3K inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *Cancer Discov.* 2017. 7(7), p. 704-715.

193. Baselga, J., Im, S.A., Iwata, H., Cortes, J., De Laurentiis, M., Jiang, Z., et al. Buparlisib plus fulvestrant versus placebo plus fulvestrant in postmenopausal, hormone receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer (BELLE-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2017. 18(7), 904-916.

194. Zhao L, Vogt PK. Class I PI3K in oncogenic cellular transformation. *Oncogene*, 2008. 27(41), 5486–96. doi: 10.1038/onc.2008.244.

195. Haybaeck J. Mechanism of molecular Carcinogenesis – Volume 2. Johannes Haybaeck. Springer, 2017. 343 p.

196. Alix-Panabières C, Pantel K. Clinical Applications of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA as Liquid Biopsy. *Cancer Discov.* 2016;6(5):479–91. DOI:10.1158/2159-8290.CD-15-1483

197. Sorber L, Zwaenepoel K, Deschoolmeester V, et al. Circulating cell-free nucleic acids and platelets as a liquid biopsy in the provision of personalized therapy for lung cancer patients. *Lung Cancer*. 2017;107:100–7. DOI:10.1016/j.lungcan.2016.04.026

198. Bodoky G, Scheulen ME, Rivera F, et al. Clinical Benefit and Health-Related Quality of Life Assessment in Patients Treated with Cisplatin/S-1 Versus Cisplatin/5-FU: Secondary End Point Results From the First-Line Advanced Gastric Cancer Study (FLAGS). *J Gastrointest Cancer*. 2015;46(2):109–17. DOI:10.1007/s12029-014-9680-1

199. Sorber L, Zwaenepoel K, Deschoolmeester V, Van Schil PE, Van Meerbeeck J, Lardon F, Rolfo C, Pauwels P. Circulating cell-free nucleic acids and platelets as a liquid biopsy in the provision of personalized therapy for lung cancer patients. *Lung Cancer*. 2017 May;107:100-107. doi: 10.1016/j.lungcan.2016.04.026.

200. Vynnychenko IO, Pryvalova AO, Vynnychenko OI, Lyndin MS, Sikora VV, Romaniuk AM. PIK3CA-mutant circulating tumor DNA in patients with breast cancer. *Azerbaijan Medical Journal (ATJ)*. 2020;3:79-88. DOI: 10.34921/amj.2020.3.010

201. Higgins MJ, Jelovac D, Barnathan E, et al. Detection of tumor PIK3CA status in metastatic breast cancer using peripheral blood. *Clin Cancer Res*. 2012;18(12):3462–9. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-11-2696

202. Samuels Y, Waldman T. Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2010;347:21–41. DOI:10.1007/82_2010_68

203. Millis SZ, Ikeda S, Reddy S, Gatalica Z, Kurzrock R. Landscape of Phosphatidylinositol-3-Kinase Pathway Alterations Across 19 784 Diverse Solid Tumors. *JAMA Oncol*. 2016;2(12):1565–73. DOI:10.1001/jamaoncol.2016.0891

204. Beaver JA, Jelovac D, Balukrishna S, et al. Detection of cancer DNA in plasma of patients with early-stage breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2014;20(10):2643–50. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2933

205. Saal LH, Holm K, Maurer M, et al. PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma. *Cancer Res.* 2005;65(7):2554–9. DOI:10.1158/0008-5472-CAN-04-3913

206. Holdenrieder S. Biomarkers along the continuum of care in lung cancer. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 2016;245:S40- 5. DOI:10.1080/00365513.2016.1208446

207. Sorber L, Zwaenepoel K, Deschoolmeester V, et al. Circulating cell-free nucleic acids and platelets as a liquid biopsy in the provision of personalized therapy for lung cancer patients. *Lung Cancer.* 2017;107:100- 7. DOI:10.1016/j.lungcan.2016.04.026

208. Oellerich M, Schütz E, Beck J, et al. Using circulating cell-free DNA to monitor personalized cancer therapy. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2017;54(3):205- 218. DOI:10.1080/10408363.2017.1299683

209. Kodahl AR, Ehmsen S, Pallisgaard N, et al. Correlation between circulating cell-free PIK3CA tumor DNA levels and treatment response in patients with PIK3CA-mutated metastatic breast cancer. *Mol Oncol.* 2018;12(6):925–35. DOI:10.1002/1878-0261.12305

210. García-Saenz JA, Ayllón P, Laig M, et al. Tumor burden monitoring using cell-free tumor DNA could be limited by tumor heterogeneity in advanced breast cancer and should be evaluated together with radiographic imaging. *BMC Cancer.* 2017;17(1):210. DOI:10.1186/s12885-017-3185-9

211. Dawson SJ, Tsui DW, Murtaza M, et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 2013;368(13):1199–209. DOI:10.1056/NEJMoa1213261

212. Линдін МС, Романюк АМ, Сікора ВВ, Зінгер ББ. Молекули клітинної адгезії раково-ембріонального антигену (СЕАСАМs): монографія. – Суми: СумДУ, 2020. – 219 с.

213. Pidddubnyi A, Romaniuk A, Radomychelski IM, Moskalenko Y, Moskalenko R. Prostate Cancer with Intraluminal Inclusions: the Association of

the Immunophenotype with Grade Score. *Iran J Pathol.* 2019;14(3):212-22. DOI: 10.30699/ijp.2019.91400.1884.

214. Piddubnyi A, Danylchenko S, Romaniuk A, Moskalenko R. Prostatic calculi cause osteoblastic immunophenotype of prostate cancer. *Pathology.* 2019;16, № 2(46):170–6. DOI: 10.14739/2310-1237.2019.2.177099

215. Piddubnyi A., Moskalenko R. Molecular aspects of the bone metastases development in prostate cancer. *Eastern Ukrainian Medical Journal.* 2019;7(2):96-108. DOI: [https://doi.org/10.21272/eumj.2019;7\(2\):96-108](https://doi.org/10.21272/eumj.2019;7(2):96-108).

216. Piddubnyi A, Moskalenko R, Romaniuk A. Intraluminal inclusions cause apoptosis in prostate cancer tissue. *Virchows Archiv.* 2020. – 447 (Suppl 1): S 166.

217. Lyndin M, Piddubnyi A, Sikora V, Romaniuk O, Kravtsova O, Romaniuk A. The features of p53 and Ki-67 expression during Gleason's grade increase in prostate cancer. *Virchows Archiv.* 2019. – 449 (Suppl 1): S 197.

218. Romaniuk A., Piddubnyi A, Lyndin M, Sikora V, Gyryavenko N, Moskalenko R. Prostate cancer leads to a change in the composition of tissue carbohydrates. *Virchows Archiv.* 2019. – 449 (Suppl 1): S 435-36.

219. 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.

220. Levesque A, Eastman A. p53-based cancer therapies: Is defective p53 the Achilles heel of the tumor? *Carcinogenesis* 2007; 28(1): 13-20.

221. 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.

222. 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.

223. 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.

224. Jindala DG, Jindalb 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.

225. 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.

226. 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.

227. Lebret T, Watson RW, Fitzpatrick JM. Heat shock proteins: their role in urological tumors. *J Urol* 2003 Jan; 169(1): 338-46.

228. 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.

229. 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.

230. 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.

231. Pulukuri SM, Rao JS. Matrix metalloproteinase-1 promotes prostate tumor growth and metastasis. *Int J Oncol* 2008 Apr; 32(4): 757-65.

232. 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.

233. 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.

234. Weber DC, Tille JC, Combescure C, Egger JF, Laouiti M, Hammad K, et al. The prognostic value of expression of HIF1 α , 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.

235. 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.

236. 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.

237. 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.

238. Hyriavenko N, Lyndin M, Sikora K, Piddubnyi A, Karpenko L, Kravtsova O, Hyriavenko D, Diachenko O, Sikora V, Romaniuk A. Serous Adenocarcinoma of Fallopian Tubes: Histological and Immunohistochemical Aspects. *J Pathol Transl Med*. 2019 Jul;53(4):236-43. DOI: 10.4132/jptm.2019.03.21.

239. Sumtsov DG, Hyriavenko NI, Sikora VV, Lyndin NS, Sumtsov GA. Ways of spread and metastasis of primary fallopian tube cancer: retrospective analysis from 1967 to 2019. *Azerbaijan Medical Journal (ATJ)*. 2020;3:70-8. DOI: 10.34921/amj.2020.3.009

240. Hyriavenko N, Lyndin M, Sikora V, Kravtsova O, Sumtsov D, Hyriavenko D, Romaniuk A. Synchronous case of the primary neuroendocrine

cancer of fallopian tube and serous papillary cancer of ovary. *Virchows Archiv.* 2019. – 449 (Suppl 1): S 330.

241. Hyriavenko N., Lyndin M, Sikora V., Karpenko L, Moskalenko R, Piddubnyi A, Romaniuk A. Peculiarities of vascularization of serous adenocarcinoma of fallopian tubes. *Virchows Archiv.* 2020. – 447 (Suppl 1): S 65.

242. Гирявенко НІ, Линдін МС, Сікора ВВ, Гирявенко ДР, Романюк АМ. Прогностичне значення експресії VEGF у тканині серозної аденокарциноми маткових труб. *Art of medicine.* 2018;3(7):30-34. <http://art-of-medicine.ifnmu.edu.ua/index.php/aom/article/view/93>

243. 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.

244. 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.

245. Riska A, Leminen A. Updating on primary fallopian tube carcinoma. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2007;86(12):1419–26.

246. 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.

247. Kalampokas E, Kalampokas T, Tourountous I. Primary fallopian tube carcinoma. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2013 Jul;169(2):155–61.

248. 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.

249. 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.

250. 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.

251. 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.

252. 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.

253. 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

254. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin*. 2016; 66(1):7-30.

255. Мурзин Я.Ю. Современные аспекты инвазивной диагностики очаговых образований лёгких: автореф. Дис. канд. мед. наук. Москва. 2012. 28с.

256. 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.