

УДК 616-006.04-076
УКПШ
№ 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

_____ Черноус А.М.

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

(проміжний)

Начальник НДЧ
канд. фіз - мат. наук, снс

Д.І. Курбатов

Науковий керівник
канд.мед наук, доцент

І.О. Винниченко

2018

Рукопис закінчено 25 грудня 2018 р.

Результати роботи розглянуто науковою радою СумДУ, протокол від
27 грудня 2018 р. № 6.

СПИСОК АВТОРІВ

Керівник НДР, Провідний науковий співробітник, канд.мед.наук	_____	Винниченко Ігор Олександрович (розділи 1,2,3,4,5)
	(25.12.2018)	
Молодший науковий співробітник, канд.мед.наук	_____	Винниченко Олександр Ігорович (розділи 1,2,3,4,5)
	(25.12.2018)	
Молодший науковий співробітник, канд.мед.наук	_____	Москаленко Юлія Василівна (розділи 1,2,3,4,5)
	(25.12.2018)	
Молодший науковий співробітник, аспірант	_____	Привалова Анастасія Олександрівна (розділ 1,2,3)
	(25.12.2018)	
Молодший науковий співробітник, аспірант	_____	Тимакова Олена Олександрівна (розділ 2,3,4)
	(25.12.2018)	
Молодший науковий співробітник, аспірант	_____	Сікора Владислав Володимирович (розділи 1,2,3,4,5)
	(25.12.2018)	
Лаборант	_____	Казбан Надія Володимирівна (розділи 1,3,5)
	(25.12.2018)	
Лаборант	_____	Смородська Ольга Миколаївна (розділи 1,3,5)
	(25.12.2018)	

РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 49 с., 5 рис., 2 табл., 72 джерел.

ЛЕГЕНІ, LIQUID BIOPSY, ІМУНОГІСТОХІМІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ,
МОЛОЧНА ЗАЛОЗА, СТАТИСТИЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ.

Об'єкт дослідження – злоякісні пухлини основних локалізацій.

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

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

Для досягнення поставленої мети були визначені такі завдання:

1) Узагальнення даних з молекулярно-генетичних досліджень у практичній онкології та оцінка демографічної, кадрової та матеріально-технічної бази;

2) Формування груп пацієнтів згідно дизайну дослідження;

3) Створення біобанку зразків пухлинної тканини, вціНК плазми крові та різних рідин організму онкологічних хворих;

4) Проведення імунофенотипування зразків тканин пухлин та молекулярно-генетичне дослідження аналізів біологічних рідин хворих;

Методи дослідження – гістологічні та імуногістохімічні дослідження біопсійного/аутопсійного інтактного матеріалу і пухлинної тканини легень й молочної залози, серологічні дослідження, статистичні методи. Використання даних досліджень спрямоване на отримання даних про імунофенотип пухлин та рівні пухлинних НК в одних і тих самих пацієнтів з встановленням їх відповідності, зміну показників під час прогресування патологічних процесів, а також варіабельність трансформацій до та після лікування.

ЗМІСТ

Вступ-----	5
1 Сучасні уявлення щодо застосування методики «liquid biopsy»-----	8
2 Вичення епідеміологічних особливостей неоплазій легень та молочної залози у жінок -----	17
3 Особливості дослідження біологічного матеріалу-----	22
4 Важливість імуногістохімічної діагностики специфічних рецепторів при лікуванні раку легень-----	28
5 Узагальнення отриманих результатів-----	37
6 Висновки-----	42
Перелік джерел посилання-----	43

ВСТУП

Однією з найзагадковіших проблем сучасного світу є онкологічна патологія [1]. Розуміння особливостей патогенезу та етіології неоплазій, які призводять до пухлинної трансформації інтактних тканин, значно розширилися останнім часом, однак значна кількість питань залишається не вирішеними. Захворювання пухлинного характеру вражають своєю чисельністю, варіаціями їх наслідків та складністю діагностики [1,2]. Цій проблемі приділяється багато уваги, але досі невирішеними залишаються питання щодо зниження захворюваності та смертності від онкопатології різної локалізації. Складність зазначеної ситуації полягає у несвоєчасності виявлення ранніх стадій первинного пухлинного процесу, відсутності ефективних шляхів первинної профілактики та таргетного лікування.

Проблема пошуку новітніх методів діагностики в онкології на сьогодні постає досить гостро. Це пояснюється зростанням потреби у персоніфікації лікування пацієнтів зі злоякісними захворюваннями, заснованій на молекулярних змінах в пухлині конкретного хворого [1,3,4]. 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.

Одним із найперспективніших методів, які використовуються, є рідинна біопсія. Вона отримала величезну увагу в онкології, завдяки своєму очевидному клінічному значенню для персоналізованої медицини [1,5,6]. Цей діагностичний метод являє собою інноваційне дослідження крові з метою виявити та проаналізувати біомаркери, що циркулюють в крові. До таких відносяться: 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 [6].

Для отримання необхідних результатів дане дослідження проводиться на найпоширеніших злоякісних новоутвореннях актуальних у всьому світі. Так, на сьогоднішній день новоутворення легень посідають провідне місце у структурі злоякісних пухлин усіх локалізацій як серед чоловічого (від 48,5 до 56,5 на 100 тис.), так і жіночого населення (від 35,8 до 37 на 100 тис.) [2,7]. Кожного року рак легень (РЛ) вперше діагностується більше ніж в одного мільйона людей в усьому світі. Не зважаючи на значні досягнення в онкології, рівень захворюваності на ракові пухлини легень зріс у декілька разів лише за одне століття [2,8]. Окрім цього, показники смертності при даній патології залишаються надвисокими (18,2% від загальної смертності від раку), хоча і використовуються при лікуванні надсучасні таргетні терапевтичні засоби. Навіть в країнах з найвищими стандартами охорони здоров'я за останні 20 років смертність від РЛ збільшилась в декілька разів (у США – у 3 рази, у країнах Європи – у 2 рази) [7,8,9].

З іншого боку, серед усіх локалізацій злоякісних пухлин виключно у жінок (30% захворюваності і 16-18% смертності) перше місце посідає рак молочної залози (РМЗ). Так, щороку цю патологію виявляють у 16 тис. українок (Україна за показниками захворюваності на РМЗ посідає 5 місце у світі; рівень становить 64,5 на 100 тис. жіночого населення) [2,10,11] – кожні 35-37 хвилин виявляється новий випадок захворювання та щогодини вмирає жінка від РМЗ. Це найбільш часта локалізація злоякісного процесу у мешканок США (реєструється у кожній восьмій жінки) та у мешканок європейських держав (у кожній десятій) [11-13]. Рівень захворюваності за останні 40 років збільшився більш ніж утричі. Згідно даних американських авторів при локалізованих стадіях РМЗ 5-річне виживання досягає 90%, при залученні підпахвинних лімфатичних вузлів – 68%, а при виникненні віддалених метастазів – 18% [13,14].

У більшості випадків початок розвитку неоплазій даних локалізацій може варіювати в залежності від провокуючих чинників. Основними етіологічними чинниками є генетична схильність, тютюнопаління, вплив факторів зовнішнього середовища (важкі метали, радіація, радон, азбест та інші канцерогени), віруси та бактерії. Це пояснює зростання ризиків захворювання населення у промислово розвинених країнах світу та місцях з високим рівнем урбанізації [4].

Хоча проблемі онкологічної захворюваності приділяється багато уваги, нажаль, досі невирішеними залишаються питання зниження захворюваності та смертності від неї. Не представляється можливим контролювати зростання захворюваності унаслідок відсутності ефективних шляхів первинної профілактики, залишаються відкритими питання діагностики РЛ та РМЗ [1,6,9,11,13,14].

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 [1,15,16].

1 СУЧАСНІ УЯВЛЕННЯ ЩОДО ЗАСТОСУВАННЯ МЕТОДИКИ «LIQUID BIOPSY»

Проблема пошуку новітніх методів діагностики в онкології на сьогодні постає досить гостро [17]. 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 [18].

Одним з найперспективніших методів, які використовуються, є рідинна біопсія. Вона отримала величезну увагу в онкології завдяки своєму очевидному клінічному значенню для персоналізованої медицини [19]. 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 [20]. 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 [19].

Циркулюючі пухлинні клітини (ЦПК)

Вперше опис ЦПК в крові хворих на рак пацієнтів був задокументований 1869 року [21]. 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 [1,17]. Чи є викид ЦПК у кровотік випадковим процесом або він зумовлений специфічною біологічною програмою, все ще залишається предметом дискусій [19, 22].

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, як наслідок висока життєздатність	Повільний; лише невеликий об'єм крові може бути дослідженим
HB-chip			
CTC-iChip			
Graphene oxide-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, 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 [17].

Циркулююча 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 [17]. 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 [20, 23]. 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 [1,17,19,20].

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 [19,24]. Загалом, таргетні методи мають вищу аналітичну чутливість, ніж нетаргетні методи, незважаючи на значні зусилля вдосконалити поріг чутливості [19,25]. 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 [18,19,26].

З моменту першого цілеспрямованого виділення мутацій в 1990 році [17,22] було розроблено високочутливі та специфічні методи для виявлення цпДНК: BEAMing, plasma Safe-Sequencing (Safe-SeqS), tagged-amplicon deep sequencing (TAm-Seq), цифрова ПЛР, які дозволяють виявити однонуклеотидні мутації у цпДНК, повногеномне секвенування (whole-genome sequencing) – встановлює зміни числа копій генів [18,19,24].

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, анеуплодія) або послідовності (транслокації, інверсії) великих фрагментів ДНК. Перспективним є визначення рівня метилювання пухлинного геному, проте значним недоліком його використання є низька специфічність, оскільки

метилування не є пухлинно-специфічним процесом і може спостерігатись в нормальних тканинах. Однак навіть враховуючи ці недоліки, визначення рівня метилування цпДНК може виявитись корисним маркером для визначення динамічних змін, що відбуваються в пухлині, та бути одним з основних скринінгових методик [23].

Виявлення раку шляхом моніторингу цпДНК отримало велику увагу [19,27,28]. 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 [19,29]. Інші дослідники показали, що у 100% пацієнтів з II – IV та у 50% з I стадією недрібноклітинного РЛ визначалась цпДНК [17,23,25]. 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 [17]. 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 [19].

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 клін: при фізіологічній загибелі нормальних клітин організму продукти їх розпаду поглинаються та перетравлюються фагоцитами, тоді як процес фагоцитування 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 [20]. 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 [17,28,29].

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 [17].

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. Саме тому, порівняння колекції сироваток хворих на злоякісні пухлини з гістологічними та імуногістохімічними результатами аналізу цих пухлин дозволить стандартизувати показники дослідження “liquid biopsy” для впровадження у лікувально-діагностичний процес.

2 ВИЧЕННЯ ЕПІДЕМІОЛОГІЧНИХ ОСОБЛИВОСТЕЙ НЕОПЛАЗІЙ ЛЕГЕНЬ ТА МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ У ЖІНОК

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 [2,7-9].

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 [30]. 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 [31-33]. У Швеції, Данії, Ісландії рівень захворюваності серед жінок перевершив аналогічні показники у чоловіків [34]. 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 %) [35-38].

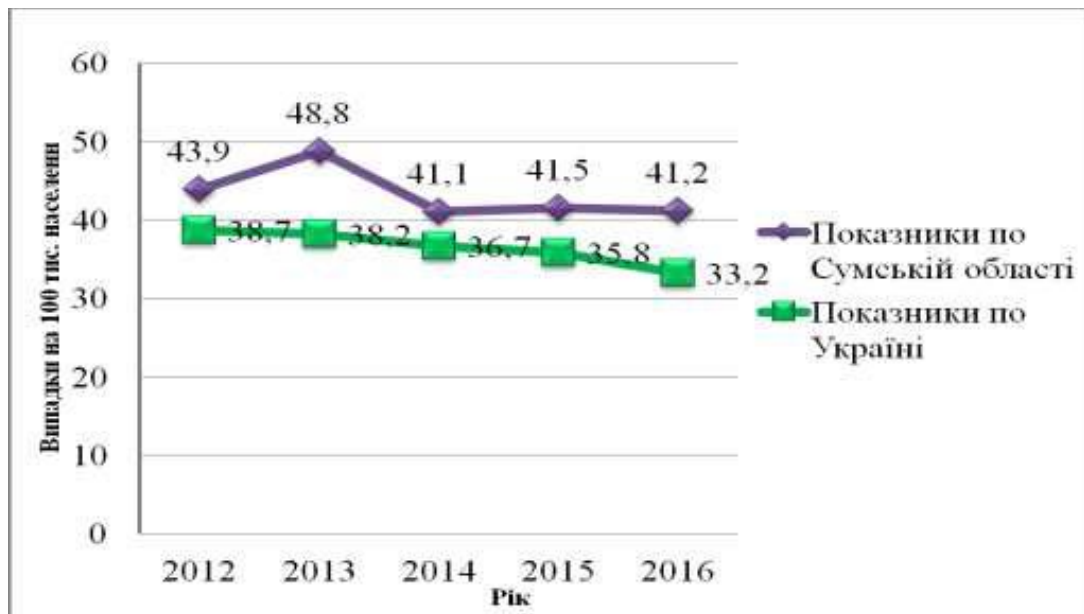


Рисунок 2.1 – Загальні показники поширеності на рак легенів у Сумській області та в Україні впродовж 2012–2016 років. Вісь абсцис – випадки на 100 тис, вісь ординат – роки.

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).

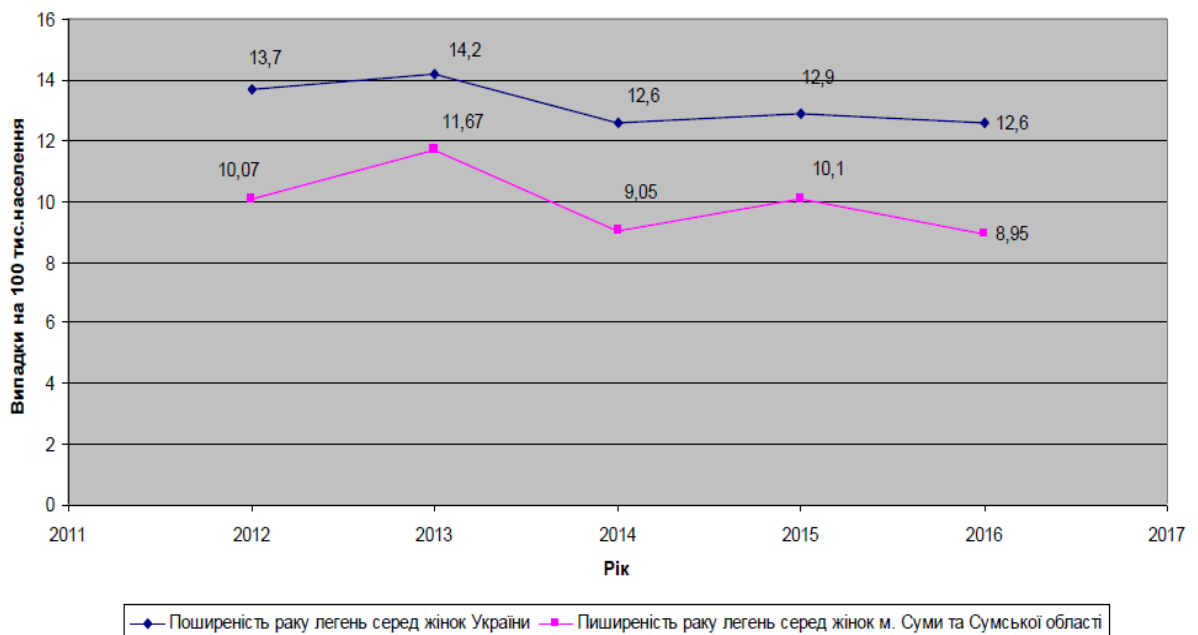


Рисунок 2.2 – Показники поширеності на рак легенів серед жінок Сумської області та України впродовж 2012–2016 років. Вісь абсцис – випадки на 100 тис, вісь ординат – роки.

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.

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).

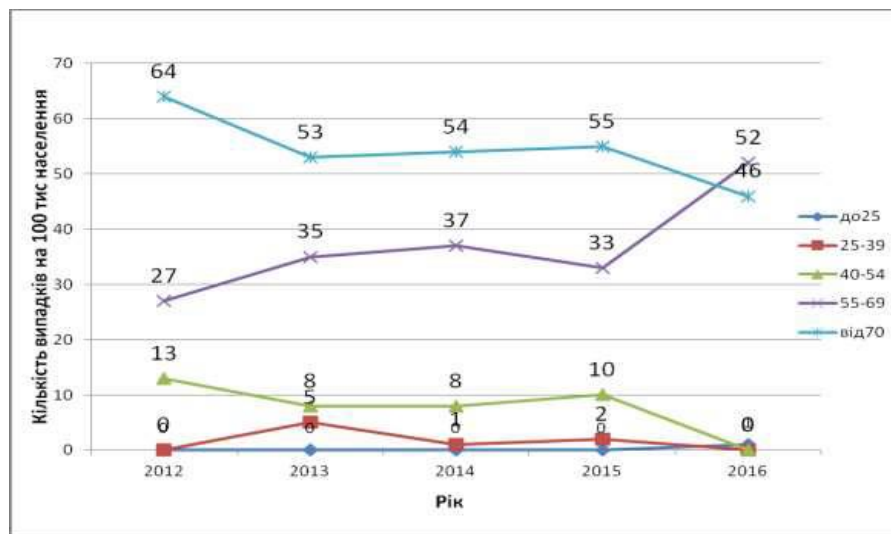


Рисунок 2.3 – Віковий розподіл жінок, хворих на рак легенів за період 2012–2016 років у Сумській області.

Також нами проаналізовано захворюваність 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 [11,13,14]. 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% склали 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.

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.

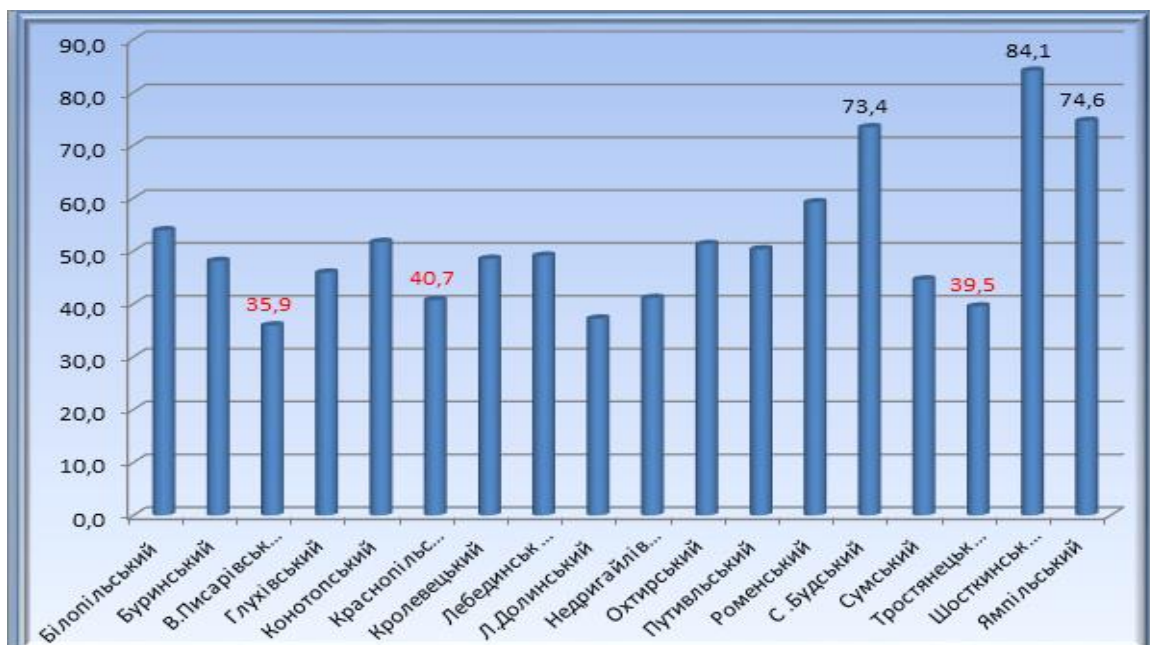


Рисунок 2.4 – Захворюваність на РМЗ в Сумській області за 2013 рік (на 100 тис. населення).

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

3 ОСОБЛИВОСТІ ДОСЛІДЖЕННЯ БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ

Відповідно до мети даного проекту, сформовано репрезентативні групи пацієнтів для коректного порівняння отриманих результатів. Під час відбору біологічного матеріалу ацентували увагу на створенні біобанку зразків пухлинної тканини, вціНК плазми крові та різних рідин організму від одних і тих самих онкологічних хворих. Основу клініко-морфологічного та імуногістохімічного досліджень склав післяопераційний та аутопсійний матеріал. Нами було відібрані зразки пухлинної тканини легень та молочної залози у Сумському обласному клінічному онкологічному диспансері за останні 10 років, з наступним аналізом особливостей мікроструктурної картини різних стадій розвитку пухлин. Нами встановлено, що серед РМЗ на першому місці стоїть інфільтративний протоковий рак молочної залози (90% випадків). Такі варіанти злоякісного процесу як медулярний рак, слизовий рак, рак Педжета, часточковий інфільтративний рак та неінфільтративні часточково-протокові варіанти РМЗ складають близько 10%. Ключових відмінностей в розподілі РМЗ за гістологічними типами, порівнюючи з обласними показниками, в «екологічно-чистих» та «екологічно-забруднених» регіонах області за період 2004-2014 роки (578 випадків) не встановлено: 91% приходить на ППРМЗ та 9% на всі інші форми РМЗ. З іншого боку, порівнявши отримані нами показники з даними літератури встановлено, що 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 [47].

Діагноз РЛ та РМЗ був верифікований за результатами гістологічного дослідження післяопераційного або аутопсійного матеріалу пухлинної тканини з імуногістохімічним дослідженням. У дослідження було включено 110 пацієнтів з РЛ та РМЗ, віком від 31 до 74 років. Середній вік хворих у 1-й групі склав $58,06 \pm 8,13$, у 2-й групі – $53,71 \pm 9,24$. Пацієнтів з РЛ було поділено на групи в залежності від гістогенезу пухлин, віку, статті, топографічної локалізації патологічного процесу та метастатичного враження. Всіх пацієнтів з РМЗ було розподілено на дві групи відповідно до стадії захворювання: 1-ша група – пацієнти з місцевопоширеною формою РМЗ (54%), 2-га група – з метастатичною формою (46%) (Табл. 3.1).

Таблиця 3.1 – Розподіл за імуногістохімічним підтипом, n

Підтип пухлини	Група пацієнтів	
	1-ша	2-га
Люмінальний А	14	13
Люмінальний В	8	6
HER2	6	4
Тричі негативний	3	3

Матеріалом для імуногістохімічного дослідження слугували парафінові блоки з пухлинною тканиною. У дослідженнях використана наступна панель антитіл («Thermo scientific», США):

- для визначення експресії рецепторів статевих гормонів моноклональні кролячі антитіла до білка естрогену та прогестерону;
- для визначення онкопротеїну HER2/neu використовували моноклональні кролячі антитіла;
- для вивчення особливостей апоптозу і порушення в системі репарації ДНК пухлинних клітин використано мишині моноклональні антитіла до рецепторів bcl-2 та p53;

- для встановлення аутогенної стимуляції ангіогенезу вивчали експресію рецепторів VEGF та ALK1;
- для вивчення поведінки імунного мікрооточенні пухлини досліджено досліджували рецептори до CD3 (маркер популяції Т-лімфоцитів), CD79 α (маркер В-лімфоцитів), CD68 (маркер макрофагів);
- для вивчення проліферативної активності ракових клітин – кролячі моноклональні антитіла до білка Ki-67;
- для вивчення росту клітин у нормальній епітеліальній тканині та їх пригнічення використано антитіла до EGFR та KRAS;
- для встановлення активності антиген-презентуючих рецепторів на поверхні пухлинних клітин використовували антитіла до PDL1.

Ступінь експресії рецепторів оцінювали за напівкількісним методом, вважаючи реакцію в 1 бал негативною, 2 бали – слабопозитивною, 3 бали – помірнопозитивною та 4 бали – сильнопозитивною.

Всім пацієнтам було виконано повне обстеження, яке включало стандартне клініко-лабораторне та рентгенологічне дослідження, комп'ютерну томографію органів грудної, черевної порожнини й головного мозку. Всі пацієнти підписали інформовану добровільну згоду на взяття зразків крові для проведення подальшого ПЛР-дослідження. Кожен пацієнт був ознайомлений з правилами підготовки до забору крові для ПЛР-дослідження: протягом доби до здачі крові бажано утриматися від прийому алкоголю, вживання гострих, жирних страв, уникати переїдання та надмірних фізичних навантажень, не палити в день взяття крові.

Забір крові проводиться з 08.00 до 12.00 год ранку, після 15-ти хвилинного відпочинку пацієнта, натще з ліктьової вени одноразовою голкою діаметром 0,8-1,1 мм у стерильну вакуумну пробірку Vacutainer з розчином ЕДТА або цитратом натрію, далі пробірка закривається і декілька разів плавно перевертається для змішування крові з антикоагулянтом. Після цього пробірка центрифугується при кімнатній температурі протягом 20 хв

при 3000 об/хв. Плазма переноситься в стерильні пробірки об'ємом 1,5 мл по 1 мл в кожен і маркується. Всі зразки поміщаються для зберігання в холодильник з температурою -20°C .

Для пацієнтів 1-ї групи взяття зразків крові проводиться за наступним графіком: кожні 2 цикли неоад'ювантної хіміотерапії, до та після проведення оперативного втручання, перед початком та впродовж (кожні 2 цикли) ад'ювантної хіміотерапії, після завершення лікування впродовж періоду спостереження (кожні 3 місяці). Після оперативного лікування забір крові відбувається через 5 днів, що пов'язано з періодом напіврозпаду циркулюючої пухлинної ДНК і вважається оптимальним строком. Для пацієнтів другої групи, які отримують тільки ПХТ, забір крові проводиться протягом періоду лікування (кожні 2 цикли) та впродовж періоду спостереження (кожні 3 місяці). Паралельно з кожним взяттям зразків для ПЛР-дослідження проводиться стандартний перелік клініко-лабораторних процедур і комп'ютерна томографія органів грудної та черевної порожнини.

Одним з онкологічних захворювань, яке можна диференціювати за допомогою вивчення показників крові є гострий лейкоз, що характеризується клональною проліферацією недиференційованих, але функціонально активних клітин-попередників, інфільтрацією ними різних тканин та органів [39,40]. У залежності від виду пухлинних клітин крові, виділяють декілька видів лейкозів, але найпоширенішим серед них є гострий лімфобластний лейкоз (ГЛЛ) (захворюваність складає 12.8 на 100 тис. осіб). За даними світової літератури ця нозологія найчастіше зустрічається у дітей віком 2-5 років, проте може розвиватися і у більш старшому віці. Хоча ГЛЛ відноситься до небезпечних захворювань, виживаність при ньому за умов відповідного лікування складає близько 80% [41,42]. Діагностика даної патології рідко проводиться, особливо в момент ремісії, що може нести за собою численні ускладнення.

Хоча ГЛЛ у вагітних зустрічається рідко, він може ускладнити перебіг гестації, підвищуючи ризик настання викидня та передчасних пологів. Проте,

у жінок, які перенесли його в дитинстві, і при їх лікуванні вдалося досягти стадії ремісії, можна спостерігати повноцінне виношення плоду. При вирішенні питання про допустимість вагітності у молодих жінок з тривалими ремісіями (більше 5 років) слід враховувати можливість рецидиву захворювання [43,44]. Існують дані про можливість розвитку імуносупресії у дітей, батьки яких хворіють на різноманітні імунodefіцитні захворювання, в тому числі ГЛЛ [45]. У зв'язку з цим, у дітей з вродженим імунodefіцитом збільшується частота ускладнень після щеплень у постнатальному періоді [46]. Нерідко такі ускладнення виникають після вакцинації проти туберкульозу, що на тлі імунodefіцитного стану може проявлятися туберкульозним ураженням різних органів і систем [45,46].

Представлений випадок демонструє наявність вродженого імунodefіциту Т-клітинної ланки у дитини (відсутністю Т-залежних зон селезінки та гіпоплазія тимусу) мати якої перенесла ГЛЛ. У свою чергу вакцинація дитини на тлі імунodefіциту через різні патофізіологічні ланки призвело до розвитку виразково-некротичного ентероколіту. Проведене лікування, яке в більшій мірі спрямоване на ірадикацію збудника, не принесло результату за рахунок ареактивності імунної системи дитини.

Даний клінічний випадок демонструє необхідність коректної діагностики наявності онкологічної патології у пацієнтів з обтяженим анамнезом, навіть за умови його повної клінічної та лабораторної ремісії протягом значного проміжку часу. Саме використання малоінвазивної ріддиної біопсії дозволяє провести комплексне дослідження всього організму у пацієнтів на етапах прогресування, рецидиву або ремісії захворювання.

Після відбору достатньої кількості матеріалу заплановано провести ґрунтовний аналіз взаємозв'язків між показниками тканинної біопсії та «liquid biopsy». Динамічне спостереження за хворими дозволить оцінити будь-які зміни у перебігу лікувального процесу та надасть можливість до його корегування. Створення нових діагностичних алгоритмів на основі отриманих результатів відкриває можливості до їх майбутньої

комерціалізації та широкого практичного використання. На підставі вивчення рецепторних особливостей пухлинної тканини та аналізі літературних даних нами відібрано найважливіші діагностичні маркери. Так, на нашу думку комплексне імуногістохімічне дослідження повинно включати наступну панель антитіл (підбір антитіл дещо різниться для діагностики РЛ та РМЗ): ER, PR, Her-2neo, bcl1, p53, CD3, CD20, CD68, VEGF, Ki-67, ALK1, KRAS, PDL-1 та EGFR. Створений нами алгоритм імуногістохімічної діагностики звужує скринінгові критерії до найдоцільніших показників діагностики та охоплює максимальний спектр молекулярно-генетичних особливостей пухлин. Отримані в ході дослідження дані проливають світло на прогноз захворювання, що є необхідною умовою для кореляції отриманих результатів з показниками вільноцируючих пухлинних ДНК в крові.

4 ВАЖЛИВІСТЬ ІМУНОГІСТОХІМІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ СПЕЦИФІЧНИХ РЕЦЕПТОРІВ ПРИ ЛІКУВАННІ РАКУ ЛЕГЕНЬ

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 імуногістохімічних досліджень з визначенням специфічних патернів у тканинах набули значної актуальності у наукових дослідженнях.

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.

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 [48]. 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 імуногістохімічне 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 [49].

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 [50].

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 [51].

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 [51]. 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. 4.1) [52].

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.

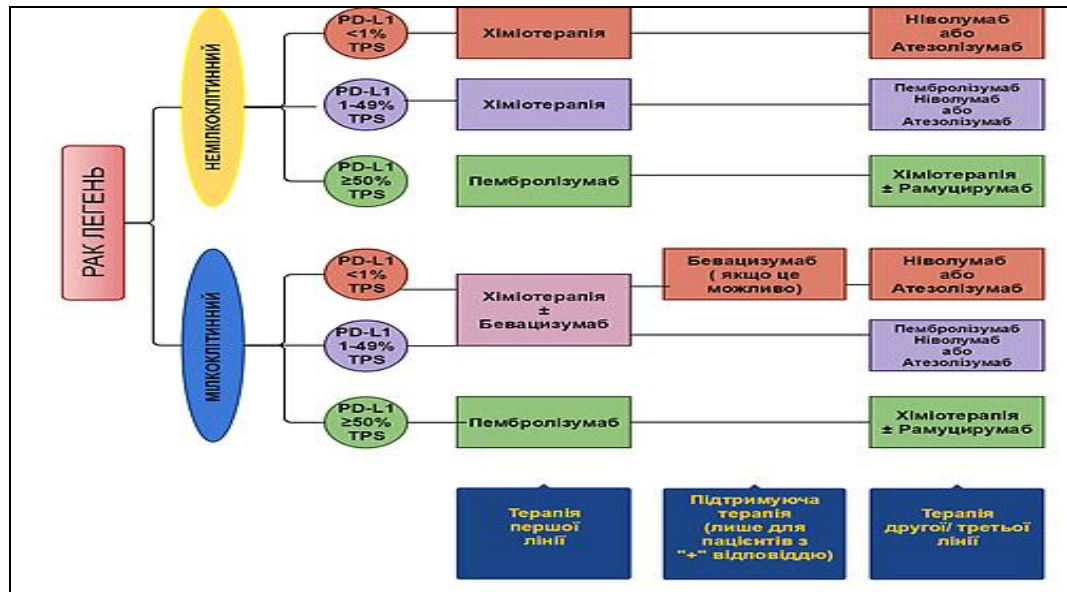


Рисунок 4.1 – Стандартизований алгоритм лікування хворих на немілоклітинний рак легень, PD-L1 – ліганд програмованої смерті клітин – 1, TPS – оцінювання частки пухлинних клітин

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 [53]. 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 [54]. 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 [55]. Взагалі вважається, що для пацієнтів з недрібноклітинним раком легенів, які не мають EGFR, ALK та ROS1 мутацій та отримали першу чи другу лінії хіміотерапії, визначення наявності PD-L1 експресії потрібне лише у разі призначення пембролізумабу.

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 [56].

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 [52]. 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 [57]. 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 [58].

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 атезолізумабу (13.8 проти 9.6 місяців). Після цього FDA схвалила атезолізумаб у якості другої лінії терапії метастатичного недрібноклітинного РЛ [59].

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 атезолізумаб [52].

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%) [60].

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 [61]. 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 [56].

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 [57].

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 атезоліумабу 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.

Так, нами було описано випадок, 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 Левера 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 2×1.5 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.

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 іпілімумаб і тремілімумаб. Наразі триває рандомізоване дослідження III фази, у якому порівнюється ефективність комбінації ніволумабу з іпілімумабом проти використання ніволумабу в режимі монотерапії та ніволумабу з хіміотерапією на основі препаратів платини [62]. Дурвалумаб разом з CTLA-4 інгібітором тремілімумабом випробовується в Ib фазі дослідження пацієнтів з метастатичним недрібноклітинним раком легенів [63].

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 легенів 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.

5 УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Швидке зростання онкологічної захворюваності, яка уражає працездатний контингент населення і має характер епідемічного лиха, стало не тільки медичною, а й соціальною проблемою. Однак, незважаючи на високий рівень медицини в прогресивно-розвинених країнах, показники захворюваності на рак залишаються на першому місці серед усіх захворювань. Цій проблемі приділяється багато уваги, але досі невирішеними залишаються питання щодо зниження захворюваності та смертності від онкопатології різної локалізації. Складність зазначеної ситуації полягає у несвоєчасності виявлення ранніх стадій первинного пухлинного процесу, відсутності ефективних шляхів первинної профілактики та лікування.

У свою чергу, 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 [19,64]. Подальші отримані результати дозволять започаткувати в Україні новий підхід до діагностики онкологічних захворювань на різних стадіях розвитку неопластичного процесу. Це слугуватиме основою для скринінгового обстеження людей з новоутвореннями різних органів. Нажаль, на сьогодні ця проблема і досі залишається не вирішеною у зв'язку з відсутністю можливості отримання тканинної біопсії значної кількості пухлин, як за рахунок її локалізації, так і загальносоматичного стану пацієнтів (наявні протипокази до оперативного втручання). Окремо питання стоїть щодо нестабільності пухлинного геному, як у первинному вогнищі, так і у віддалених метастазах. Певні пухлинні локалізації характеризуються неможливістю отримання тканинної біопсії для верифікації клінічного діагнозу та встановлення молекулярно-генетичних особливостей тканини для проведення таргетної, системної протипухлинної терапії. 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.

Все більш очевидно, що РЛ є багатоступеневим процесом у генетично схильних до його розвитку індивідуумів. Про це свідчать такі генетичні зміни, як втрата хромосомного матеріалу (делеція ділянки хромосоми 3p21), мутації в туморсупресорних генах (p53), мутації чи зміни експресії протоонкогенів (RAS, NEU, JUN, MYC, c-ERB-B2). У складному взаємопов'язаному процесі виникнення і розвитку злоякісної пухлини важлива роль належить гомеостатичним факторам росту: інсуліноподібному (IGF), епідермальному (EGF), трансформуючому (TGF) та гормонам

(кальцитоніну, АКТГ, нейрон-специфічній енолазі, окситоцину, в-ендорфіну та ін.). Ініціаторами виникнення злоякісного росту в легеневій тканині можуть бути як чинники зовнішнього середовища, так і внутрішні зміни в організмі. Частота EGFR мутацій (рецепторів епідермального фактору росту пухлини) серед білого населення складає приблизно 10 %, до того ж частіше зустрічається у жінок, які ніколи не палили, з гістологічним підтипом аденокарцинома. Найбільш поширена дана мутація в східно-азіатських країнах [65]. Ген EML4-ALK, що є результатом інверсії у хромосомі 2 та визнаний промотором онкологічного процесу, мають близько 5 % пацієнтів з аденокарциномою і також переважно жінки [66,67]. У Китаї до 90 % хворих на аденокарциному легень мають EGFR, KRAS, ALK або HER2 мутації [68]. HER2 мутації виявляються приблизно у 2–4 % випадків [69]. KRAS мутації спостерігаються у 34 % курців і у 6 % осіб, що ніколи не палили. У пацієнтів з історією паління до 20 років, EGFR мутація переважає над KRAS. Багатовимірний аналіз показав, що серед колишніх курців з раком легені, незалежно від тривалості паління, збільшення стажу без цієї звички підвищує ймовірність мутації EGFR [70]. На відміну від EGFR, KRAS мутації не мають статевих вподобань і характерні для чоловіків і жінок, що є колишніми або теперішніми курцями [71,72]. У Сумській області рівень захворюваності на РЛ у жінок є низьким у порівнянні зі світовими показниками. Для прикладу, у США захворюваність 43,3 на 100 000 жіночого населення, у Китаї – 20,1 на 100 000, у Швеції – 19,2 на 100 000, в той час як у Сумській області лише 9,22 на 100 000 жінок. У порівнянні із загальноукраїнським рівнем жителями Сумщини також значно рідше хворіють на злоякісні пухлини легенів – 13,2 проти 9,97 на 100 000, хоча згідно даних Національного канцер-реєстру Сумська область належить до регіонів з високим рівнем захворюваності. У Сумській області РЛ у жінок найбільш поширений серед вікової групи старше 70 років. У 2016 році спостерігалось перевищення захворюваності серед пацієток віком 55 – 69 років над особами віком старше 70 років, тобто прослідковується тенденція до ”омолодження” раку. Тому основною

причиною розвитку РЛ у жінок не є промислові канцерогени та радіація. Постає питання про роль генетичних мутацій. Сьогодні діагностика EGFR, KRAS, ALK та HER2 мутацій не входить в програму профілактичного обстеження. Вони не вважаються базовими, хоча схеми хіміотерапевтичного лікування пацієнтів-носіїв мутації принципово відрізняються.

Також нами проаналізовано захворюваність 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. 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).

Аналізуючи вищезазначене, можна стверджувати, що онкологічна захворюваність в Сумській області неухильно росте та за останні 10 років її показники прогресивно збільшилися. Виявлено переважання пухлинного враження саме у тих регіонах, в яких спостерігається підвищена кількість забруднюючих факторів у навколишньому середовищі. Залежності між формою, розміром, наявністю метастазів, поширенням на навколишні тканини та групою розподілу тканин не виявлено. У ході імуногістохімічного дослідження тканину РЛ та РМЗ було виявлено високу чутливість до досліджуваних маркерів у абсолютній більшості досліджуваних зразків. Нами було відмічено залежність рівня експресії між основними рецепторами, активністю неопластичної тканини та ступенем диференціювання. Саме це підкреслює важливість діагностики даної патології.

Отримані результати дозволять 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.

ВИСНОВКИ

1. Використання «liquid biopsy» 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 новоутворення легень та молочної залози в Сумській області. 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. За показниками виявлення неоплазій за останні роки спостерігається тенденція до "омолодження" раку.

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

4. Здійснено теоретичний опис плану молекулярно-генетичних досліджень та запропоновано сучасну скринінгову панель визначення імуногістохімічних маркерів у злоякісних новоутвореннях найпоширеніших локалізацій на основі сучасних лікувально-діагностичних протоколів.

ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ

1. Heymach J, Krilov L, Alberg A, Baxter N, Chang SM, Corcoran R, et al. Clinical Cancer Advances 2018: Annual Report on Progress Against Cancer From the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol*. 2018 Apr 1;36(10):1020-1044. doi: 10.1200/JCO.2017.77.0446.
2. Siegel R. Cancer statistics, 2015. / R. Siegel, K. Miller, A. Jemal // *CA Cancer J Clin*. – 2015. – P. 65:5-29.
3. 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.
4. Committee on Policy Issues in the Clinical Development and Use of Biomarkers for Molecularly Targeted Therapies, Board on Health Care Services, Institute of Medicine, The National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine; Graig LA, Phillips, JK, Moses, HL, editors. Biomarker tests for molecularly targeted therapies: key to unlocking precision medicine. Washington (DC): National Academies Press (US); 2016.
5. Passiglia F, Bronte, G, Castiglia M et al. Prognostic and predictive biomarkers for targeted therapy in NSCLC: for whom bell tolls? Expert opinion on biological therapy. 2015, doi: 10.1517/14712598.2015.1071348.
6. Bennet C. W, Berchem G, Kim Y.J, El-Khoury V. Cell-free DNA and next generation sequencing in the service personalized medicine for lung cancer. *Oncotarget*. 2016; 7 (43):71013-71035.
7. Jemal A1, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward et al. .Global cancer statistics, *A Cancer J Clin*. 2011;61:69–90.
8. 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.

9. 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.
10. Зотов А. С. Мастопатии и рак молочной железы / А. С. Зотов, Е. О. Белик. – М: МЕДпресс-информ, 2005. – 112 с.
11. WHO classification of tumours of the breast. IARC/World health organization classification of tumours / [S. R. Lakhani, I. O. Ellis, S. J. Schnitt at all.] – Lyon, France: WHO Press, 2012.
12. 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.
13. Гаргін В. В. Патологоанатомічна діагностика передракових процесів молочної залози / В. В. Гаргін. // Медицина сьогодні і завтра. – 2015. – №1. – С. 15-18.
14. Breast cancer before age 40 years / [C. K. Anders, R. Johnson, J. Litton at all.]. // *Semin Oncol.* – 2009. – №3. – P. 237-249.
15. Haybaeck J. Mechanism of molecular Carcinogenesis, Volume 2 / Johannes Haybaeck. – Springer, 2017. – 343 p.
16. Федянин М.Ю. 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.
17. Haybaeck J. Mechanism of molecular Carcinogenesis, Volume 2 / Johannes Haybaeck. – Springer, 2017. – 343 p.
18. 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.
19. 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.

20. 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

21. 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.

22. 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.

23. 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>

24. Murtaza M, Dawson SJ, Tsui DW, Gale D, Forshew 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 Forshew, AM Piskorz, et al. // *Nature.* – 2013. – 497. – P. 108–112.

25. 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.

26. 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.

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

28. Spellman PT, Gray JW. Detecting cancer by monitoring circulating tumor DNA / PT Spellman, JW Gray// *Nat Med.* – 2014. – 20. – P. 474–5.

29. 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.

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

31. 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.

32. 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.

33. 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.

34. 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.

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

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

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

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

39. Jon C. Aster, Daniel J. DeAngelo. Chapter 21: Acute Leukemias. In: Bunn H., Aster J., editors. *Pathophysiology of Blood Disorders.* The McGraw-Hill Companies, Inc; 2011. P. 244—259.

40. Rytting, ME, ed. (November 2013). "Acute Leukemia". *Merck Manual Professional.* Merck Sharp & Dohme Corp. Retrieved 17 April 2014.

41. Hoelzer D., Bassan R., Dombret H., Fielding A., Ribera J., Buske C. Acute lymphoblastic leukaemia in adult patients: ESMO Clinical Practice

Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* (2016) 27 (suppl 5): v69-v82.

42. Rudant J., Lightfoot T., Urayama K., Petridou E., Dockerty J., et al. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia and Indicators of Early Immune Stimulation: A Childhood Leukemia International Consortium Study. *Am J Epidemiol*. 2015 Apr 15; 181(8): 549–562.

43. Stensheim H, Møller B, van Dijk T et al. Cause-specific survival for women diagnosed with cancer during pregnancy or lactation: a registry-based cohort study. *J Clin Oncol* 2009; 27: 45–51.

44. Tal Shapira, David Pereg, Michael Lishner. How I treat acute and chronic leukemia in pregnancy. *Blood Reviews* 2008; 22: 247–259.

45. Campbell A. G. Immunisation for the immunosuppressed child. *Arch Dis Child* 1988; 63: 113-114.

46. Susanna Esposito, Elisabetta Prada, Mara Lelii, Luca Castellazzi. Immunization of children with secondary immunodeficiency. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 2016;11 (11), 2564-2570.

47. 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.

48. NSCLC Meta-Analyses Collaborative Group. Chemotherapy in addition to supportive care improves survival in advanced non-small-cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 16 randomized controlled trials. *J Clin Oncol*.2008;26(28):4617-4625.

49. 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.

50. 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.

51. 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.

52. 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.

53. 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.

54. 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.

55. 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.

56. 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.

57. Caicun Zhou, Yi-Long Wu, Gongyan Chen, et al. A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Multicenter, Phase III Study of First-Line Carboplatin/Paclitaxel Plus Bevacizumab or Placebo in Chinese Patients With Advanced or Recurrent Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol.* 2015;33(19): 2197-2203.

58. Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, et al. Nivolumab versus docetaxel in advanced squamous-cell non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2015;373(2):123-135.

59. Rettmeyer A, Barlesi F, Waterkamp D, et al. OAK Study Group. Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (OAK): a phase 3, open-label, multicenter randomized controlled trial. *Lancet*. 2017;389(10066):255-265.

60. 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.

61. 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.

62. 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.

63. 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.

64. 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. Leigh // *Frontiers in oncology*. – 2014. – 4. – P. 204.

65. Rekhtman N, Paik PK, Arcila ME, Laura J. Tafe LJ et al. Clarifying the spectrum of driver oncogene mutations in biomarker-verified squamous carcinoma of lung: lack of EGFR/KRAS and presence of PIK3CA/AKT1 mutations, *Clin Cancer Res*. 2012;18(4):1167-76.

66. Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, Shaw AT, Solomon B et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer, *N Engl J Med*. 2010;363(18):1693–03.

67. Shaw A.T, Yeap B.Y, Mino-Kenudson M, Digumarthy SR, Daniel B. Shaw AT, Yeap BY, Mino-Kenudson M et al. . Clinical features and outcome of

patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK. *J Clin Oncol.* 2009;27:4247–53.

68. Sun Y, Ren Y, Fang Z, Li C, Fang R, Gao B, et al. Lung adenocarcinoma from East Asian never-smokers is a disease largely defined by targetable oncogenic mutant kinases. *J Clin Oncol.* 2010;28:4616–4620.

69. ME Arcila, JE Chaft, K Nafa, Roy-Chowdhuri S, Christopher Lau et al. : Prevalence, clinicopathologic associations and molecular spectrum of ERBB2 (HER2) tyrosine kinase mutations in lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res.* 2012;18(18):4910–18.

70. Dogan S, Shen R, Ang D, Johnson M, D'Angelo S. et al. Molecular Epidemiology of EGFR and KRAS Mutations in 3026 Lung Adenocarcinomas: Higher Susceptibility of Women to Smoking-related KRAS-mutant Cancers. *Clin Cancer Res.* 2012;18(22):6169–77.

71. Suzuki M, Shigematsu H, Iizasa T, Hiroshima K, Nakatani Y et al. Exclusive mutation in epidermal growth factor receptor gene, HER-2, and KRAS, and synchronous methylation of nonsmall cell lung cancer. *Cancer.* 2006;106:2200–7.

72. Toh CK, Gao F, Lim WT, Leong SS, Fong KW et al. Never-smokers with lung cancer: epidemiologic evidence of a distinct disease entity. *J Clin Oncol.* 2006;24(15):2245-51.