

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ  
НАЦІОНАЛЬНИЙ ІНСТИТУТ РАКУ**

**ВЕРЬОВКІНА НАТАЛІЯ ОЛЕГІВНА**

**УДК 618.19 – 006.6 – 036.2 – 097**

**УДОСКОНАЛЕННЯ ЛІКУВАННЯ ХВОРИХ НА МІСЦЕВО  
ПОШИРЕНИЙ РАК ГРУДНОЇ ЗАЛОЗИ З УРАХУВАННЯМ  
ІМУНОБІОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ПУХЛИНИ**

**14.01.07 – онкологія**

**АВТОРЕФЕРАТ  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата медичних наук**

**Київ – 2017**

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Національному інституті раку

Науковий керівник: доктор медичних наук  
**Сивак Любов Андріївна,**  
Національний інститут раку,  
завідувач науково-дослідного відділення  
хіміотерапії солідних пухлин

Офіційні опоненти: доктор медичних наук, професор  
**Бондаренко Ігор Миколайович,**  
Державний заклад Дніпропетровська  
медична академія МОЗ України,  
завідувач кафедри онкології та медичної радіології

кандидат медичних наук  
**Пономарьова Ольга Володимирівна,**  
Інститут експериментальної патології, онкології  
радіобіології імені Р.Є. Кавецького НАН України  
науковий співробітник відділу моніторингу  
пухлинного росту та дизайну терапії

Захист відбудеться 31 січня 2018 року о 13 годині  
на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.560.01  
в Національному інституті раку (03022, м. Київ, вул. Ломоносова, 33/43)

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці  
Національного інституту раку (03022, м. Київ, вул. Ломоносова, 33/43)

Автореферат розісланий 26 грудня 2017 року

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради

С. О. Родзаєвський

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Рак грудної залози (РГЗ) є надзвичайно розповсюдженою онкологічною патологією. За даними Національного канцер-реєстру, в Україні щорічно виявляється близько 16 – 17 тис. хворих на РГЗ, показник захворюваності посідає перше місце серед усіх онкологічних нозологій і коливається в межах з 66 – 72 випадки на 100 тис. жіночого населення, а щорічний приріст цієї онкологічної патології перевищує 2 % (З. П. Федоренко, та співавт. 2016).

Успіхи терапії РГЗ пов'язані з ефективністю стратегії впливу на типові для РГЗ мішені такі як рецептори естрогену та прогестерону, протеїн HER-2/neu. Незважаючи на потенціал антиестрогенної терапії гормонозалежного РГЗ, за даними мета-аналізу Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group, більш ніж у 20 % пацієнтів з ранніми стадіями виникає рецидив захворювання, а у пацієнтів з місцево поширеними та метастатичними формами РГЗ розвивається резистентність до ендокринної терапії і прогресія захворювання.

Водночас необхідно відзначити, що сучасні терапевтичні стратегії, спрямовані на максимальне видалення пухлинних клітин, пов'язані з високим ризиком серйозних побічних ефектів, при цьому розвиток резистентності ракових клітин, які вижили, фактично унеможливує досягнення повної регресії (Zitvogel L., 2008, 2011; Andre F., 2012; Denkert C., 2011; Bhatia S., 2012; Savas P., 2015). Вивчення цих питань у багатьох фундаментальних та клінічних дослідженнях в галузі онкології, імунології, молекулярної біології сприяло розумінню того, що при проведенні специфічного лікування значну роль у процесі циторедукції відіграють власні протипухлинні механізми організму і, перш за все, імунна система. Клітини, що належать як до системи вродженого, так і набутого імунітету (макрофаги, NK-клітини, різні субпопуляції Т-клітин), активно залучаються до зростаючої пухлини, починаючи з самих ранніх етапів її розвитку. На сьогодні в літературі активно обговорюється роль імунної системи та механізми дії імунних клітин не тільки в канцерогенезі, а й у визначенні ефективності цитостатичної та таргетної терапії при різних видах солідних пухлин (De Nardo D., 2011; Hua Fang, 2013; Ming-Ju Tsai, 2014; Н. В. Чердынцева, 2015; Guido Kroemer, 2015; S. E. Stanton, 2016; George Plitas, 2016.). Дотепер РГЗ не розглядали як типову імуногенну пухлину. Але багатьма дослідниками переконливо доведена роль імунної системи в процесах виникнення та прогресування РГЗ, а також показаний кореляційний зв'язок між інфільтрацією тканини пухлини імунокомпетентними клітинами (пухлина-інфільтруючі лімфоцити – ПІЛ, tumor-infiltrating lymphocytes TILs) як з відповіддю на неоад'ювантну терапію, так і з виживаністю (Denkert C., 2010; Loi Sh., 2013, 2014; Ali H., 2014, 2016; Ruffell B., 2012; Liu S., 2014). Актуальними є роботи, присвячені ролі окремих підтипів лімфоцитів (Лц), які входять до складу імунного інфільтрату, а також його варіації (низький, середній та високий ступінь пухлина-інфільтруючих лімфоцитів) при різних молекулярних підтипах РГЗ. Так, С. Denkert et al., (2010) оцінювали значимість лімфоцитів, що інфільтрують пухлину, як незалежного фактора прогнозування

відповіді пухлини на неоад'ювантну терапію при РГЗ. Отримані результати дозволили авторам виділити підгрупу пухлин грудної залози, яка характеризується наявністю лімфоцитарної інфільтрації пухлини та вираженою відповіддю на неоад'ювантну хіміотерапію (НАХТ). Результати дослідження FinHER trial (2014) підтвердили статистично значимий взаємозв'язок між підвищенням лімфоцитарної інфільтрації пухлини і зниженням ризику рецидиву при тричі негативному і HER-2/neu гіперекспресуючому РГЗ. У дослідженні Н. Ali et al., (2014), виявлено, що наявність CD8+ Т-клітин у тканині пухлини пов'язана зі зменшенням ризику смерті на 28 % в підгрупі ER негативних пухлин (n = 2402).

Більшість наукових досліджень з вивчення механізмів дії хіміотерапевтичних засобів та променевої терапії були сфокусовані на внутрішньоклітинних механізмах реалізації протипухлинного ефекту. Але дані останніх фундаментальних та клінічних досліджень вказують на важливість позаклітинних факторів, а особливо – протипухлинної імунної відповіді, які, опосередковують цитотоксичну дію хіміотерапевтичних агентів та променевої терапії (F. Andre et al., 2013; L. Zitvogel et al., 2011; G. Kroemer et al., 2013; S. Shiao et al., 2011). Традиційні протипухлинні засоби (антрацикліни, оксаліплатин, таксани, циклофосфамід) можуть індукувати імуногенну загибель клітин, що в свою чергу стимулює протипухлинну імунну відповідь. Механізм імуногенної загибелі пухлинних клітин реалізується шляхом вивільнення біологічно активних речовин, таких як ядерний негістоновий ДНК-зв'язуючий білок HMGB1 (high mobility group box1 protein). Під час загибелі клітини під впливом хіміотерапевтичних засобів чи променевої терапії – HMGB1 протеїн вивільняється та зв'язується з тол-подібними рецепторами (TLR-2 та TLR-4) на дендритних клітинах стромы пухлини і стимулює дозрівання антиген-презентуючих клітин та активацію протипухлинної імунної відповіді.

CCR5 (С-С рецептор хемокіну 5) – білок, який кодується відповідним геном і є рецептором адгезії, розташованим на Т-лімфоцитах, макрофагах, дендритних клітинах, та контролює міграцію Т-регуляторних лімфоцитів, супресорних клітин мієлоїдного походження в пухлинне мікрооточення та перепрограмує його в бік пригнічення протипухлинної імунної відповіді.

Отже, вивчення проблем, сфокусованих на біологічних властивостях пухлини, виявленні причин, чому ті чи інші підтипи РГЗ можуть або не можуть індукувати протипухлинну імунну відповідь, та яким чином системна хіміотерапія змінює оточення пухлини імунокомпетентними клітинами визначає актуальність даного дослідження.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота виконана відповідно до плану науково-дослідних робіт Національного інституту раку: «Оптимізувати лікування хворих на «тричі негативний» метастатичний рак грудної залози» (номер державної реєстрації 0114U001063, шифр теми ВН.14.01.07.152-14, термін виконання: 2014 – 2016 рр.) та «Оптимізувати тактику лікування хворих на метастатичний рак грудної

залози прогностично несприятливих молекулярних підтипів» ( номер державної реєстрації 0114U000407, шифр теми ВН. 14.01.07.173-17, термін виконання: 2016 –2018 рр.).

**Мета дослідження:** підвищити ефективність лікування хворих на місцево поширений рак грудної залози шляхом прогнозування чутливості до хіміотерапії на підставі імунобіологічних маркерів пухлинної тканини.

**Завдання дослідження:**

1. Вивчити особливості лімфоїдної інфільтрації CD4+, FOXP3+ та CD8+ лімфоцитами у стромі пухлини у хворих на місцево поширений рак грудної залози.
2. Вивчити молекулярно-генетичні особливості поліморфізму генів TLR-2, TLR-4 та CCR5 у хворих на місцево поширений рак грудної залози.
3. Дослідити асоціацію різних алельних форм генів TLR-2, TLR-4 та CCR5 з безпосередньою ефективністю передопераційної хіміотерапії у хворих на місцево поширений РГЗ.
4. Визначити зв'язок імунобіологічних маркерів у стромі пухлинної тканини з безпосередньою ефективністю передопераційної хіміотерапії у хворих на місцево поширений РГЗ.
5. Оцінити прогностичну роль імунобіологічних та молекулярно-генетичних характеристик пухлини в ефективності лікування при місцево поширеному РГЗ.
6. Розробити алгоритм лікування хворих на місцево поширений РГЗ з урахуванням молекулярно-біологічних маркерів пухлини.

*Об'єкт дослідження:* місцево поширений рак грудної залози.

*Предмет дослідження:* безпосередні та віддалені результати лікування хворих на місцево поширений рак грудної залози ІІВ – ІІІВ стадій.

**Методи дослідження:** загальноклінічні, інструментальні, патоморфологічні, імуногістохімічні, молекулярно-генетичні, статистичні.

**Наукова новизна отриманих результатів.** Отримано нові наукові дані щодо прогностичного впливу інфільтрації стромі пухлинної тканини CD4+, CD8+ та FOXP3+ лімфоцитами на перебіг захворювання і результати лікування хворих на місцево поширений рак грудної залози.

Вперше науково доведено асоціацію поліморфізму генів CCR5, TLR-4 та TLR-2 з перебігом захворювання та ефективністю хіміотерапії у хворих на місцево поширений рак грудної залози.

Вперше визначено імунобіологічні маркери пухлинної тканини (співвідношення CD4+/CD8+ лімфоцитів та FOXP3+ лімфоцити), за допомогою яких можна прогнозувати перебіг місцево поширеного РГЗ різних молекулярних підтипів. Визначено імунобіологічні маркери пухлинної тканини, що прогнозують ефективність хіміотерапії у хворих на місцево поширений РГЗ, та розроблено прогностичну модель визначення резистентності/чутливості до хіміотерапії.

Уперше запропоновано алгоритм прогнозування чутливості до ПХТ у хворих на місцево поширений РГЗ, які не досягли задовільного ступеня терапевтичного патоморфозу після НАХТ, та вибору оптимального режиму ад'ювантної хіміотерапії (АХТ).

**Практичне значення отриманих результатів.** Для покращення результатів лікування хворих на місцево поширений РГЗ доцільно визначати поліморфізм гена CCR5 (del32) : прогнозується вища ефективність хіміотерапії у разі виявлення генотипу N/del32 за геном CCR5 (del32).

Доцільно включення рівня FOXP3 + лімфоцитів у резидуальній пухлині в стандартні алгоритми стратифікації груп ризику, які включають визначення кількості уражених лімфовузлів, рівень Ki-67 та об'єм життєздатної залишкової пухлинної тканини (ОЖЗПТ) після НАХТ.

У хворих на РГЗ, які не досягли задовільного ступеня патоморфозу після НАХТ, при виборі режиму ад'ювантної терапії рекомендовано: додатково, до визначення стандартних критеріїв оцінки факторів ризику, визначати кількість стромальних CD4+ лімфоцитів та Ki-67 у резидуальній пухлині.

Застосування розробленої моделі прогнозування чутливості до хіміотерапії у пацієнтів, які не досягли задовільного ступеня терапевтичного патоморфозу після НАХТ оптимізує вибір режиму ад'ювантної хіміотерапії.

**Особистий внесок здобувача.** Разом з науковим керівником дисертантка визначила тему роботи і на підставі самостійно проведеного інформаційно-патентного пошуку та аналізу наукової літератури сформулювала мету і завдання. Здійснила аналіз анамнестичних даних, клінічне обстеження хворих, добір, вивчення, аналіз та узагальнення клінічного матеріалу.

Автором безпосередньо реалізовано протокол дослідження, контроль за його виконанням. Оцінено результати лікування та сформовано комп'ютерну базу даних, здійснено статистичну обробку, теоретичне узагальнення отриманих результатів, виявлені закономірності сформульовано у висновках.

У дисертаційній роботі здобувачем не були використані наукові ідеї співавторів публікацій.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення дисертації обговорювалися на: науково-практичних конференціях молодих вчених «Перспективи діагностики та лікування онкологічної патології» (Київ, 2016), «Онкологія сьогодні: від діагностики до лікування» (Київ, 2017), науково-практичних конференціях з міжнародною участю: «Персоніфікація лікування гормонозалежних пухлин» (Яремче, 2015), «Сучасні досягнення діагностики та терапії раку грудної залози» (Київ, 2015); на XIII з'їзді онкологів та радіологів України (Київ, 2016); IX з'їзді онкологів та радіологів країн СНД та Євразії: (Мінськ, 2016); European Society for Medical Oncology, Immuno-Oncology Symposium (Лозанна, 2015) та ESMO Congress (Мадрид, 2017).

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 17 наукових праць, з них 8 статей у наукових фахових виданнях України (з них: 1 – в зареєстрованому в міжнародних наукометричних базах), 9 – у матеріалах і тезах конференцій та з'їздів.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертаційна робота написана українською мовою і складається з анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів дослідження, розділів власних досліджень, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних літературних джерел, який містить 122 найменування (10 кирилицею, 112 латиницею). Дисертація викладена на 151 сторінці машинописного тексту, ілюстрована 30 таблицями та 23 рисунками.

## **ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ**

**Матеріали та методи дослідження.** Для досягнення поставленої мети в дослідження включили 112 хворих з вперше виявленим РГЗ ІВ–ІІВ стадії, яким було показано комплексне лікування за радикальною програмою. Усі хворі надали письмову інформовану згоду на участь у дослідженні. Це дослідження має дизайн проспективно-ретроспективного та нерандомізованого. Програма дослідження була схвалена комісією з біоетики Національного інституту раку. У процесі лікування одна пацієнтка вибула з дослідження через те, що після радикальної мастектомії у неї не було підтверджено РГЗ, а виявлено карциносаркому лівої грудної залози. Таким чином, у статистичному аналізі враховано результати обстеження та лікування 111 пацієнток.

Усім пацієнткам було виконано стандартний алгоритм обстеження, який включав мамографію, рентгенографію легень, УЗД лімфатичних вузлів; за показами додатково призначали комп'ютерну або магнітно-резонансну томографію. Відповідно до стандартів всім хворим виконано трепанобіопсію пухлини грудної залози.

Морфологічні та імуногістохімічні дослідження проводили у патологоанатомічному відділенні Національного інституту раку (зав. відділенням канд. мед наук Кротевич М.С.). За стандартним діагностичним алгоритмом в матеріалі трепанобіопсії пухлини грудної залози визначали гістологічний тип, ступінь диференціювання (G), індекс проліферативної активності Ki-67, експресію рецепторів ER, PR, HER-2/neu, а також додатково визначали кількість CD4+, CD8+ та FOXP3+ Лц у стромі пухлини.

Усім пацієнткам одноразово проводили забір 5,0 мл периферичної крові для молекулярно-генетичного дослідження, яке виконували в молекулярно-генетичній лабораторії Державного закладу «Референс-центр з молекулярної діагностики МОЗ України» (директор канд. мед.наук Россоха З.І.).

Визначення поліморфізму генів TLR-4 (C399T) та TLR-2 (G753A) виконували методом полімеразної ланцюгової реакції з аналізом поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів (ПЛР-ПДРФ). Геномну ДНК виділяли з периферичної крові за допомогою комерційної тест-системи innuPREP Blood DNA Mini Kit (Analytik Jena, Німеччина) за інструкцією виробника. Необхідні фрагменти генів TLR-2 (rs5743708) та TLR-4 (rs4986791) ампліфікували за допомогою комерційного набору DreamTaq Green PCR Master Mix (Thermo Scientific, США) з використанням специфічних олігонуклеотидних праймерів (Metabion, Німеччина). Продукти ампліфікації ділянок генів TLR-2 та TLR-4 підлягали гідролітичному розщепленню за допомогою ендонуклеаз рестрикції

MspI и HinfI (Thermo Scientific, США) відповідно. Рестрикційні фрагменти генів TLR-2 і TLR-4 аналізували в 3 % агарозному гелі (Cleaver Scientific, Великобританія) з додаванням бромистого етидію.

При дослідженні поліморфізму гена CCR5 (del32) ДНК виділяли з периферичної крові за допомогою комерційної тест-системи innuPREP Blood DNA Mini Kit (Analytik Jena, Німеччина). Досліджувану ділянку гена ампліфікували за допомогою специфічних праймерів (Metabion, Німеччина) із використанням комерційного набору DreamTaq Green PCR Master Mix (Thermo Scientific, США). Стан ампліфікованих фрагментів гена аналізували в 3 % агарозному гелі (Cleaver Scientific, Великобританія) з додаванням бромистого етидію. Для оцінки розміру фрагментів вносили маркер молекулярної маси GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific, США), візуалізували розподіл фрагментів у гелі за допомогою транслюмінатора. Обробку отриманого зображення проводили в комп'ютерній програмі Vitran. Результати алейспецифічної ПЛР ділянки гена CCR5 (del32) враховували залежно від довжини наявних ампліфікованих фрагментів – 172 п.н. та/або 140 п.н.

Після встановлення діагнозу РГЗ та виконання стандартного алгоритму обстеження (Наказ МОЗ України «Про затвердження протоколів надання медичної допомоги за спеціальністю «онкологія» від 17.09.2007 № 554) призначали НАХТ схемою FAC (циклофосфамід 500 мг/м<sup>2</sup> – 1 день, доксорубіцин – 50 мг/м<sup>2</sup> – 1 день, флуороурацил – 500 мг/м<sup>2</sup> – 1 день).

Перед кожним циклом ПХТ здійснювали загальноклінічне обстеження: оцінку скарг, анамнезу супутніх захворювань, фізикальний огляд, оцінку розмірів пухлини РГЗ та стану аксилярних лімфовузлів. Також виконували загальний та біохімічний аналіз крові, загальний аналіз сечі.

Оцінку токсичності лікування проводили впродовж лікування за критеріями токсичності (Common Toxicity Criteria NCI V.4.0).

Оцінку ефективності НАХТ проводили після 2-х курсів хіміотерапії за допомогою мамографії та УЗД аксилярних лімфовузлів.

Після досягнення пухлиною критеріїв резектабельності пацієнткам виконували радикальне оперативне лікування (мастектомію, квадрантектومیю або секторальну резекцію з регіонарною лімфодисекцією).

Проводили морфологічне дослідження пухлинного матеріалу трепано-біопсії та після радикального оперативного втручання. Фіксацію проводили в 10 % розчині нейтрального формаліну. Проводку матеріалу, виготовлення гістологічних препаратів виконували за стандартною методикою. Препарати забарвлювали гематоксиліном і еозином. Оцінку терапевтичного патоморфозу виконували на основі визначення ОЖЗПТ (за класифікацією Miller-Payne), наявності раку *in situ*, а також кількості та розмірів уражених лімфовузлів.

Інфільтрацію пухлинної тканини імунокомпетентними клітинами оцінювали в препаратах, забарвлених гематоксиліном та еозином, аналізували у 10 полях зору та визначали у відсотках: відсутня або слабо виражена (+) < 10 %, помірна (++) – 10 – 50 %, значно виражена (+++) – >50 %.



Імуногістохімічне (ІГХ) дослідження здійснювали на депарафінізованих зрізах пухлин РГЗ з використанням моноклональних антитіл (МкАТ): Estrogen Receptor  $\alpha$  – (Dako IS657 Monoclonal Mouse Anti-Human Clone 1D5), Progesterone Receptor – (Dako IS068 Monoclonal Mouse Anti-Human Clone PgR 636), c-erbB-2 Oncoprotein – (DBS DS-PDR003-A Rabbit Polyclonal Antibody to Human) маркер проліферуючих клітин Ki-67 – (Dako IS626, Monoclonal Mouse Anti-Human Ki-67 Antigen Clone MIB-1), FOXP3+ лімфоцити — FOXP3 (клон 5H5L12, «Invitrogen», США), CD4+-лімфоцити та CD8+-лімфоцити – MoHu anti CD4 T-Cell Clone MT310 та MoHu anti-CD8, T-Cell Clone C8/144B (Dako, Данія). Для детекції зазначених білків використовували систему візуалізації EnVision™ FLEX (Dako, Данія). Результати ІГХ реакції оцінювали напівкількісним методом, шляхом підрахунку кількості позитивно забарвлених клітин – індекс мітки (ІМ) у відсотках. Експресію маркерів визначали у 1000 пухлинних клітин. Кількість FOXP3+, CD4+ та CD8+ Лц аналізували у 10 полях зору (ПЗ) та визначали у відсотках.

Після оперативного лікування пацієнтам призначали АПХТ за схемами FАС. (доксорубіцин – 50мг/м<sup>2</sup>, ендоксан – 500мг/м<sup>2</sup>, 5 фторурацил – 500мг/м<sup>2</sup> – 1-й день) або АТ (доксорубіцин – 50мг/м<sup>2</sup>, паклітаксел – 175мг/м<sup>2</sup> – 1-й день). Розподіл у групи проводили залежно від ступеня досягнутого терапевтичного патоморфозу та наявності/відсутності відомих факторів ризику.

Стратифікація пацієнток у групи проводилась наступним чином:

– група I – пацієнти з V, IV та III ступенем патоморфозу продовжували АПХТ за схемою FАС;

– група III – пацієнтам з II та I ступенем патоморфозу та наявності двох і більше відомих факторів ризику призначили АПХТ за схемою АТ;

– група II – пацієнти з II ступенем патоморфозу та наявності одного з факторів ризику:

а) гормонезалежні ER(-) PR(-) пухлини при відсутності метастазів в аксиллярні лімфовузли;

б) гормонозалежні ER(+) PR(+) пухлини при наявності низькодиференційованої пухлини (G3) або кількості уражених лімфовузлів, яка відповідає критерію pN2 (за класифікацією TNM, 6-те вид. 2002р.).

У групі II схему АХТ призначали за рівнем досягнутого терапевтичного патоморфозу: якщо ОЖЗПТ > 40 %, призначали АХТ за схемою АТ; якщо ОЖЗПТ складав ≤ 40 % – у післяопераційному періоді продовжували лікування за схемою FАС. Після закінчення АПХТ пацієнткам призначали променеву терапію, а у разі люмінального типу РГЗ – гормонотерапію.

Математична обробка включала наступні методи: розрахунок первинних статистичних показників (середнього арифметичного, помилки середнього, середньоквадратичного відхилення та ін.); виявлення відмінностей між групами за статистичними ознаками; встановлення взаємозв'язку між змінними методом параметричного та непараметричного кореляційного аналізу; встановлення виду залежностей (показників від досліджуваних факторів) за допомогою регресійного аналізу; оцінку (розрахунок) внеску дії фактора у зміну показників

за допомогою дисперсійного аналізу. Також, використовувались методи багатовимірної статистики: кластерний та факторний аналіз. Імовірності загального та безрецидивного виживання обчислено за допомогою моделі пропорційних ризиків Кокса та розраховано співвідношення ризиків з 95 % інтервалом вірогідності (ВІ). Для аналізу ризику виникнення рецидиву в перші 24 міс. після лікування і побудови системи його прогнозування використано метод аналізу нейромережових моделей. Аналогічний метод використано для прогнозування чутливості/резистентності до хіміотерапії. Для оцінки адекватності моделей прогнозування використано метод побудови та аналізу кривих операційних характеристик моделей (ROC-кривих), оцінку якостей прогнозування проводили за площею під кривою операційних характеристик (AUC) та показниками чутливості, специфічності, прогностичності позитивного та негативного результатів, розраховані відповідні 95 % ВІ показників. Для первинної підготовки таблиць та проміжних розрахунків використали пакет Excel. Математична обробка здійснена з використанням стандартних статистичних пакетів STATISTICA 10.0 та MedStat.

**Результати дослідження та їх обговорення.** Загалом у дослідження включено 111 пацієток віком від 29 до 69 років, середній вік ( $49 \pm 10,3$ ) років. Після встановлення діагнозу РГЗ пацієток включали у дослідження. За стадіями РГЗ Ів стадію (T2N1M0, T3N0M0) – мали 63 хворих (56,76 %), ІІа (T0-3N2M0, T3N1-2M0) – 32 хворих (28,832 %) та ІІв стадію (T4N0-3M0, T0-4N3M0) – 16 (14,41 %) хворих.

При гістологічному дослідженні матеріалу пухлини грудної залози у переважній більшості пацієток 94 (84,68 %) виявили помірно диференційовані (G2), у 14 (12,61 %) – низько диференційовані (G3) і лише у трьох (2,7%) – високодиференційовані (G1) пухлини. При ініціальному обстеженні у 56 (50,45 %) пацієток у пухлинах виявлено експресію рецепторів естрогену (ER+), у 52 (46,84%) – прогестерону (PR+), у 55 (49,55 %) пацієток не виявлено експресії рецепторів стероїдних гормонів.

За результатами вивчення особливостей лімфоїдної інфільтрації у пухлинній тканині встановлено, що у групі хворих з ER– місцево поширеним РГЗ частіше зустрічались пухлини з вираженою інфільтрацією лімфоїдними клітинами (ПЛ) порівняно з хворими з ER+ пухлинами ( $p=0,00002$ ). Також виявлено пряму кореляційну залежність між кількістю FOXP3+ Лц до початку лікування та показниками індексу проліферативної активності Ki-67 у резидуальній пухлині після завершення НАХТ ( $r=0,88$ ;  $p=0,04$ ). Отже, нами встановлено, що наявність лімфоїдної інфільтрації, ступінь її вираженості відрізнялися у пацієнтів з різними молекулярними підтипами РГЗ.

**Взаємозв'язок імунобіологічних маркерів пухлинної тканини з ефективністю передопераційної хіміотерапії РГЗ.** При дослідженні зв'язку імунобіологічних маркерів у стромі пухлинної тканини з ефективністю передопераційної хіміотерапії виявлено, що ОЖЗПТ був достовірно меншим за наявності вираженої лімфоїдної інфільтрації ПЛ (+++) порівняно з групою з помірною ПЛ (++) або низькою ПЛ (+) ( $p < 0,05$ ). При вивченні субпопуляцій

лімфоцитів, які формують імунний інфільтрат навколо залишкової пухлини після НАХТ, було виявлено обернений кореляційний зв'язок між рівнем ОЖЗПТ та кількістю стромальних CD4+ ( $r = -0,3$ ;  $p = 0,004$ ) і перитуморальних CD8+ ( $r = -0,2$ ;  $p < 0,05$ ) Лц. Крім того, при дослідженні імунного інфільтрату залишкової пухлини після завершення НАХТ виявлено пряму кореляційну залежність між індексом проліферативної активності Ki-67 та кількістю стромальних CD8+ лімфоцитів ( $r = 0,45$ ;  $p < 0,001$ ).

Проведено порівняння прогностичної значимості імунобіологічних маркерів пухлинної тканини (рівня інфільтрації пухлинної тканини FOXP3+ Лц) із відомими факторами ризику (наявність метастазів в аксиллярних лімфатичних вузлах (категорія pN згідно з класифікацією TNM), рівень Ki-67 та ОЖЗПТ після завершення НАХТ) у пацієнтів з місцево поширеним РГЗ, які не досягли повної патоморфологічної регресії. При порівнянні прогностичної цінності діагностичних тестів розраховувалась площа під ROC-кривою. Проводили порівняння прогностичної цінності кожного з факторів ризику окремо і прогностичної цінності використання декількох факторів одночасно. Не доведено самостійного впливу рівня інфільтрації FOXP3+ Лц на ризик розвитку раннього рецидиву, тоді як включення цього показника в багатофакторну логістичну модель прогнозування ризику раннього рецидиву у хворих на місцево поширений РГЗ після НАХТ підвищує її прогностичну цінність. Для порівняння прогностичної значимості гістологічних та імунобіологічних маркерів пухлинної тканини розраховувалась площа під ROC-кривою. На рисунку 1 представлені ROC-криві тестів прогнозування ризику виникнення раннього рецидиву за рівнем Ki-67, ОЖЗПТ, pN та за допомогою 3-факторної логістичної моделі (FOXP3, pN, Ki-67).

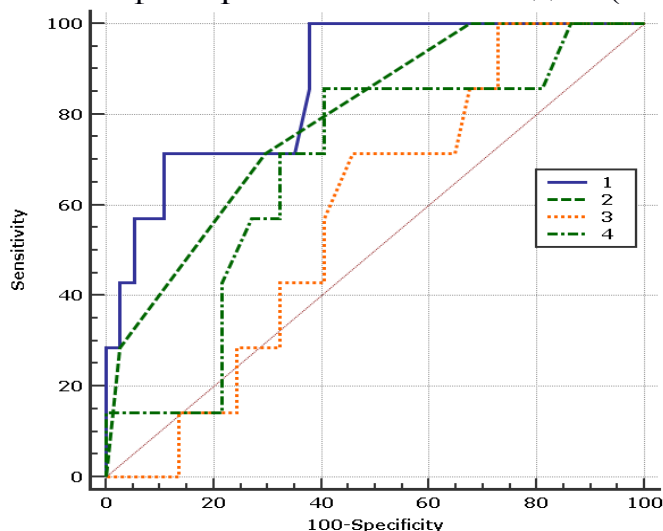


Рис.1 ROC-криві тестів прогнозування ризику виникнення раннього рецидиву: 1 – 3-факторна логістична модель (FOXP3, pN, Ki-67); 2 – за ознакою ураження регіональних лімфатичних вузлів pN; 3 – за рівнем ОЖЗПТ; 4 – за рівнем Ki-67 після НАХТ

У таблиці 1 представлена порівняльна характеристика ROC-кривих при використанні різних прогностичних моделей.

Таблиця 1

Порівняння ROC-кривих при використанні різних моделей прогнозування раннього рецидиву у хворих на місцево поширений РГЗ

Прогностичний тест	AUC (площа під ROC-кривою)	95 % ВІ
3- факторна модель (FOXP3, pN, Ki-67)	0,867	0,730 – 0,950
pN	0,788	0,638 – 0,896
ОЖЗПТ	0,581	0,423 – 0,728
Ki-67	0,680	0,522 – 0,812

**Особливості поліморфізму генів TLR-2, TLR-4 та CCR5 у хворих на місцево поширений рак грудної залози.** При дослідженні поліморфізму гена TLR2 (G753A) нами виявлено, що генотип GG за геном TLR-2 (G753A) спостерігався у 55 (88,7 %), а генотип GA – у 7 (11,3 %) пацієток; генотип CC за геном TLR-4 (C399T) – у 54 (87 %) пацієток, генотип CT – у 6 (9,6 %), а генотип TT за геном TLR-4 (C399T) – у 2 (3,4 %) пацієток. Генотип N/N за геном CCR5 (del32) виявлено у 46 (73,8 %) пацієток, генотип N/del32 за геном CCR5 у – 15 (24,6 %) пацієток та генотип del32/del32 за геном CCR5 – у 1 (1,6 %) пацієтки.

Результати нашого дослідження показали, що у хворих на РГЗ, носіїв генотипу N/N за геном CCR5 (del32), достовірно частіше виявляли пухлини без експресії рецепторів естрогену та прогестерону (RR=3,27; 1,05÷5,49; p<0,05). Також встановлено, що ОЖЗПТ був достовірно нижчим у пацієток з генотипом N/del32 за геном CCR5 (del32) (p=0,04), що потребує подальшого дослідження з метою його використання у якості предиктивного маркера. Крім того, доведено асоціацію гена TLR2 з розповсюдженістю процесу: у носіїв генотипу GA гена TLR2 (G753A) частіше виявляли метастази в аксиллярні лімфатичні вузли ( $\chi^2=5,75$ ; p=0,01).

**Прогностичне значення гістологічних та імунобіологічних маркерів пухлинної тканини у хворих на місцево поширений РГЗ.** Аналіз впливу гістологічних та імуногістохімічних факторів на загальну та безрецидивну виживаність проводили шляхом побудови двофакторних моделей пропорційних інтенсивностей Кокса та розрахунку співвідношення ризиків з 95 % інтервалом вірогідності. У таблиці 2 наведені результати оцінки впливу кожного з факторів (з урахуванням стандартизації за схемою хіміотерапії) на загальну виживаність (ЗВ) хворих.

Таблиця 2

Коефіцієнти двофакторних моделей Кокса прогнозування загальної виживаності хворих з місцево поширеним РГЗ при стандартизації за схемою ХТ

Показник	Коефіцієнт моделі, $b \pm m$	Рівень значущості відмінності коефіцієнта моделі від 0, $p$	Показник відношення ризиків, ВР (95% ВІ)	
Вік, років	0,049±0,027	0,07	1,05 (1,00–1,11)	
Менструальний статус	0,65±0,46	0,15	1,92 (0,79–4,70)	
СТАДІЯ	1 vs 4	-0,98±0,74	0,18	0,38 (0,09–1,59)
	2 vs 4	-2,95±1,20	0,01	0,05 (0,01–0,55)
	3 vs 4	-0,39±0,72	0,59	0,68 (0,17–2,77)
T	0,08±0,38	0,83	1,08 (0,51–2,30)	
N	0 vs 1	1,82±1,06	0,08	6,2 (0,8–48,9)
	2 vs 1	2,57±1,06	0,02	13,0 (1,6–105)
	3 vs 1	2,31±1,43	0,11	10,1 (0,6–165)
G	1,27±0,55	0,02	3,57 (1,20–10,6)	
ER	-1,18±0,77	0,12	0,30 (0,07–1,38)	
PR	-1,10±0,76	0,15	0,33 (0,07–1,49)	
ОЖЗПТ	-0,012±0,010	0,20	0,99 (0,97–1,01)	
Ступінь патоморфозу	-0,14±0,44	0,75	0,87 (0,37–2,05)	
ПЛ	-0,11±0,30	0,71	0,90 (0,50–1,60)	
CD4 <sup>+</sup> stromальні	0,0054±0,0089	0,54	1,01 (0,99–1,02)	
CD4 <sup>+</sup> перитуморальні	0,030±0,068	0,66	0,97 (0,85–1,11)	
CD8 <sup>+</sup> stromальні	0,013±0,010	0,20	1,01 (0,99–1,03)	
CD8 <sup>+</sup> перитуморальні	-0,006±0,016	0,71	0,99 (0,97–1,02)	
FOXP3	0,064±0,086	0,45	1,07 (0,90–1,26)	
Ki-67	0,012±0,008	0,12	1,01 (1,00–1,03)	

У таблиці 3 наведені результати оцінки впливу кожного з факторів ризику (з урахуванням стандартизації за схемою АХТ) на показники безрецидивної виживаності (БРВ) хворих.

Таблиця 3

Коефіцієнти двофакторних моделей Кокса прогнозування безрецидивної виживаності хворих з місцево поширеним РГЗ при стандартизації за схемою ХТ

Показник		Коефіцієнт моделі, $b \pm m$	Рівень значущості відмінності коефіцієнта моделі від 0, $p$	Показник відношення ризиків, ВР (95 % ВІ)
Вік, років		0,017±0,020	0,40	1,02 (0,99–1,06)
Менструальний статус		0,36±0,39	0,35	1,44 (0,67–3,06)
Стадія	1 vs 4	-1,02±0,63	0,11	0,36 (0,10–1,25)
	2 vs 4	-1,22±0,67	0,07	0,30 (0,08–1,09)
	3 vs 4	-0,44±0,63	0,49	0,65 (0,19–2,23)
T		-0,26±0,35	0,45	0,77 (0,39–1,53)
N	0 vs 1	0,18±0,52	0,73	1,19 (0,43–3,32)
	2 vs 1	0,62±0,54	0,25	1,86 (0,64–5,42)
	3 vs 1	1,81±0,72	0,01	6,1 (1,5–24,8)
G		1,05±0,49	0,03	2,85 (1,10–7,40)
ER		-0,78±0,47	0,10	0,46 (0,18–1,16)
PR		-0,92±0,50	0,07	0,40 (0,15–1,07)
ОЖЗПТ		0,0020±0,0073	0,79	1,00 (0,99–1,02)
Ступінь патоморфозу		-0,69±0,44	0,12	0,50 (0,21–1,19)
ПЛ		0,08±0,25	0,76	1,08 (0,66–1,76)
CD4 <sup>+</sup> стромальні		0,0020±0,0080	0,80	1,00 (0,99–1,02)
CD4 <sup>+</sup> перитуморальні		-0,083±0,068	0,23	0,92 (0,81–1,05)
CD8 <sup>+</sup> стромальні		0,0092±0,0077	0,24	1,01 (0,99–1,02)
CD8 <sup>+</sup> перитуморальні		-0,002±0,011	0,83	1,00 (0,98–1,02)
FOXP3		0,16±0,08	0,04	1,17 (1,00–1,36)
Ki-67		0,0097±0,0057	0,09	1,01 (1,00–1,02)

За результатами дослідження нами визначено підвищення ризику виникнення метастазів із збільшенням FOXP3+ Лц у імунному інфільтраті після НАХТ HR=1,17 (ВІ 95 %; 1,00–1,36;  $p = 0,04$ ) на кожен відсоток. Також за допомогою моделі пропорційних інтенсивностей Кокса було вивчено вплив співвідношення рівня стромальних CD4<sup>+</sup> та CD8<sup>+</sup> Лц в інфільтраті навколо резидуальної пухлини після НАХТ у хворих з місцево поширеним РГЗ. При цьому виявлено, що ризик смерті від РГЗ був найнижчим у пацієнтів із співвідношенням Лц CD4<sup>+</sup><sup>низький</sup>/ CD8<sup>+</sup><sup>високий</sup> порівняно з пацієнтами із співвідношенням Лц CD4<sup>+</sup><sup>низький</sup>/ CD8<sup>+</sup><sup>низький</sup> ВР =2,8 (ВІ 95 %; 0,8–9,8), з пацієнтами – із співвідношенням CD4<sup>+</sup><sup>високий</sup>/ CD8<sup>+</sup><sup>низький</sup> Лц в імунному інфільтраті після НАХТ ВР =4,01 (ВІ 95%, 0,97–16,5) та з співвідношенням

CD4<sup>високий</sup>/ CD8<sup>високий</sup> ВР =7,75 (ВІ 95%, 1,98–30,27), ( $\chi^2=7,48$  при 3 ступенях свободи;  $p < 0,05$ ). Проте, статистично значимого впливу співвідношення лімфоїдних клітин в імунному інфільтраті залишкової пухлини після НАХТ на БРВ не виявлено ( $\chi^2=6,1$  при 3 ступенях свободи;  $p=0,1$ ).

**Прогнозування ефективності хіміотерапії у хворих на місцево поширений РГЗ.** Перспективним напрямом підвищення ефективності лікування цієї категорії хворих є визначення індивідуальних факторів, які б надавали інформацію щодо чутливості пухлини до хіміопрепаратів. З метою виявлення набору факторних ознак, пов'язаних з ризиком недосягнення задовільного ступеня терапевтичного патоморфозу, використано метод побудови та аналізу багатофакторних моделей регресії. В процесі відбору було виділено 2 факторні ознаки: кількість стромальних CD4+Лц та рівень Ki-67. Модель побудована на цих ознаках адекватна ( $\chi^2=7,5$  при 2 ступенях свободи;  $p=0,02$ ).

В таблиці 4 представлено зв'язок факторних ознак з ефективністю хіміотерапії у хворих на місцево поширений РГЗ .

*Таблиця 4*

Аналіз зв'язку факторних ознак з ефективністю хіміотерапії у хворих на місцево поширений РГЗ (двофакторна логістична модель регресії)

Факторна ознака	Значення коефіцієнта моделі, $b \pm m$	Рівень значущості відмінності показника від 0	Показник відношення шансів, ВШ (95 % ВІ)	Показник детермінації моделі регресії, $R^2$ Nagelkerke
Ki-67	0,009 $\pm$ 0,009	0,32	1,01 (0,99–1,03)	0,12
CD4 <sup>стромальні</sup>	-0,032 $\pm$ 0,012	0,01	0,97 (0,95–0,99)	

Встановлено, що при зростанні рівня стромальних CD4+ лімфоцитів ризик недосягнення задовільного ступеня терапевтичного патоморфозу зменшується ( $p=0,01$ ), ВШ = 0,97 (95 % ВІ 0,95–0,99) на кожен відсоток зростання показника (при стандартизації за рівнем Ki-67).

На рисунку 2 наведена ROC-крива цього тесту (модель адекватна, AUC=0,70 95 % ВІ 0,59–0,80).

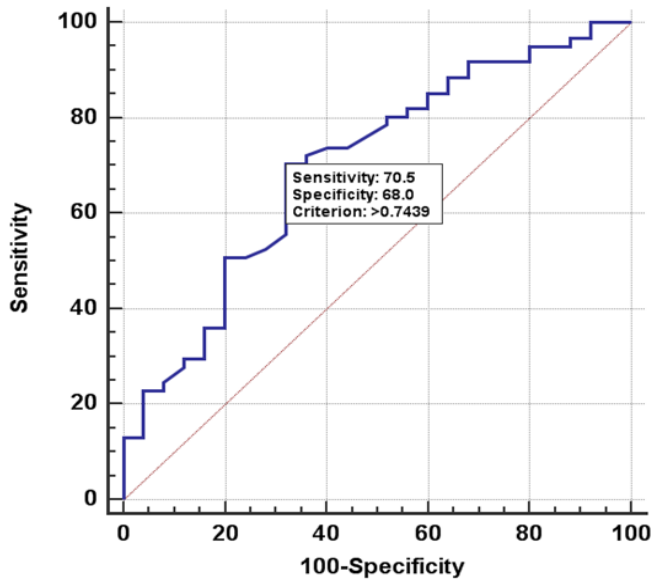


Рис.2. ROC-крива 2-факторної моделі прогнозування чутливості до хіміотерапії у пацієнтів за рівнем показника стромальних CD4+ лімфоцитів та Ki-67

При виборі оптимального порога чутливість тесту складає 70,5 % (95 % ВІ 57,4–81,5%), специфічність – 68,0 % (95 % ВІ 46,5 – 85,1%).

Отримана модель може бути виражена рівнянням:

$$\ln\left(\frac{Y}{1-Y}\right) = 0,009 \cdot Ki - 0,032 \cdot CD4^{n\dot{o}} + 1,04$$

де,  $Y$  – імовірність ефективності схеми FAS при недосягненні задовільного рівня терапевтичного патоморфозу після НАХТ у хворих на місцево поширений РГЗ.

Критичний поріг тесту  $Y_{crit} = 0,744$  (при значенні  $Y < Y_{crit}$  прогнозується задовільний результат, при  $Y \geq Y_{crit}$  – незадовільний). Для проведення розрахунків модель була реалізована в середовищі табличного процесора Excel (файл «Prognose PATH. xls»). На рисунку 3 наведено інтерфейс системи прогнозування ефективності хіміотерапії.

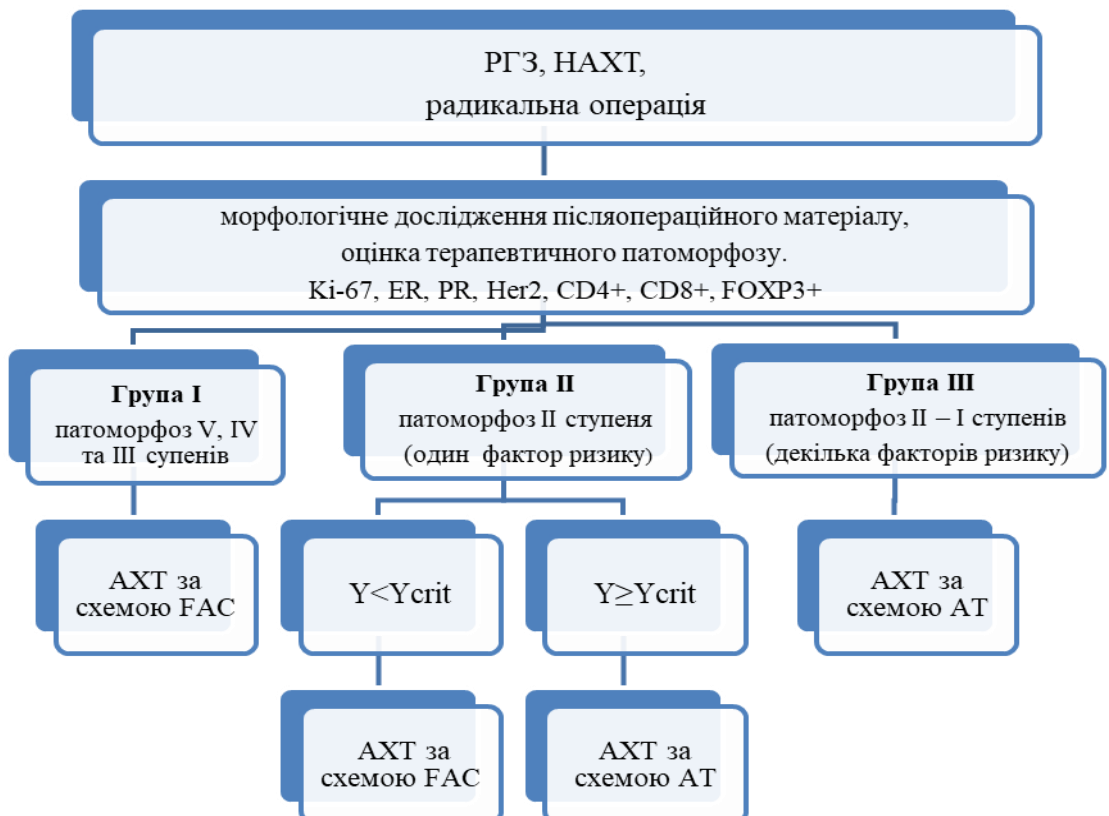


	A	B	C	H	I	J	K	L	M	N
1										
2										
3	Ki67	=	28							
4					Y=	0.776			Високий ризик	
5	CD4 <sup>стр.</sup>	=	2							
6										
7										
8										
9										

Рис. 3. Інтерфейс системи прогнозування ефективності хіміотерапії у пацієнтів з місцево поширеним РГЗ, які не досягли задовільного терапевтичного патоморфозу, за рівнем показника стромальних CD4+ лімфоцитів та Ki-67

Для використання програми необхідно ввести значення показників CD4+ лімфоцитів та Ki-67 у відповідні комірки та натиснути клавішу ENTER. Система розраховує імовірність та видає прогноз ризику неефективності хіміотерапії. За результатами даної роботи нами розроблено алгоритм вибору схеми ПХТ в ад'ювантному режимі у хворих, що не досягли задовільного ступеня патоморфозу після НАХТ, який представлено на рисунку 4.

Рис. 4. Алгоритм вибору ад'ювантної ПХТ у хворих на місцево поширений РГЗ, які не досягли задовільного ступеня терапевтичного патоморфозу після НАХТ



## ВИСНОВКИ

У дисертації подано теоретичне обґрунтування та нове вирішення наукового завдання в галузі клінічної онкології – підвищити ефективність лікування хворих на місцево поширений рак грудної залози за рахунок визначення оптимального режиму хіміотерапії шляхом прогнозування чутливості до неї на підставі імунобіологічних маркерів пухлинної тканини. Отримані в результаті було розділено на дві групи, які відображають прогностичне та предиктивне значення досліджених маркерів пухлинної тканини.

1. При вивченні особливостей лімфоїдної інфільтрації пухлинної тканини у хворих з місцево поширеним РГЗ встановлено, що в пухлинах без експресії рецепторів стероїдних гормонів частіше зустрічалась виражена інфільтрація лімфоїдними клітинами порівняно з пухлинами з їх експресією (33,33 % проти 13,63 %,  $p=0,00002$ ); а НАХТ була достовірно ефективнішою у пацієток з пухлинами з вираженою лімфоїдною інфільтрацією ПІЛ (+++) порівняно з пухлинами з середнім ступенем ПІЛ (++) та низьким ступенем ПІЛ (+) ( $p<0,05$ ).

2. Встановлено пряму кореляційну залежність між кількістю стромальних CD8+ лімфоцитів та індексом проліферативної активності Ki-67 у залишковій пухлині після НАХТ ( $r=0,45$ ;  $p<0,001$ ).

3. Доведено асоціацію гена TLR2 з розповсюдженістю пухлинного процесу: у носіїв генотипу GA гену TLR2 (G753A) частіше виявляли метастази в аксиллярні лімфатичні вузли ( $\chi^2=5,75$ ;  $p=0,01$ ).

4. Досліджено, що рівень терапевтичного патоморфозу був кращим у пацієток з генотипом N/del32 за геном CCR5(del32). Середні значення ОЖЗПТ у носіїв алеля N/N за геном CCR5 були  $52,94\pm 4,06$  %, а у носіїв алеля N/del32 за геном CCR5 –  $35,63 \pm 7,37$  % ( $p=0,04$ ). Впливу поліморфізму генів TLR-2 (G753A) та TLR-4 (C399T) на ефективність хіміотерапії не виявлено.

5. Встановлено, що ризик смерті від РГЗ відрізнявся у пацієнтів з різним співвідношенням CD4+ та CD8+лімфоцитів навколо залишкової пухлини після завершення НАХТ. Найнижчим він був у пацієнтів з співвідношенням лімфоцитів CD4+<sup>низький</sup>/CD8+<sup>високий</sup> порівняно з пацієнтами із співвідношенням лімфоцитів CD4+<sup>низький</sup>/CD8+<sup>низький</sup> – ВР =2,8 (ВІ 95 %, 0,8–9,8), із співвідношенням CD4+<sup>високий</sup>/CD8+<sup>низький</sup> – ВР =4,01 (ВІ 95 %, 0,97–16,5) та з співвідношенням CD4+<sup>високий</sup>/CD8+<sup>високий</sup> – ВР =7,75 (ВІ 95 %, 1,98–30,27), відповідно ( $p < 0,05$ ).

6. Доведено, що збільшення кількості FOXP3+ лімфоцитів у резидуальній пухлині підвищує імовірність рецидиву ВР =1,17 (ВІ 95 %, 1,00–1,36;  $p = 0,04$ ) на кожен відсоток при стандартизації за схемою хіміотерапії; а рівень FOXP3+ лімфоцитів ( $b\pm m$  коефіцієнт моделі,  $0,16\pm 0,08$ ) у резидуальній пухлині після завершення НАХТ перевищує за своєю значущістю рівень показника Ki-67 ( $b\pm m$  коефіцієнт моделі,  $0,0097\pm 0,0057$ ) з метою стратифікації груп ризику.

7. Виявлено зворотний кореляційний зв'язок між рівнем ОЗЖПТ та кількістю стромальних CD4+ ( $r=-0,3$ ;  $p=0,004$ ) та перитуморальних CD8+ ( $r=-0,2$ ;  $p < 0,05$ ) лімфоцитів.

8. Розроблено алгоритм прогнозування чутливості до хіміотерапії та вибору ад'ювантної хіміотерапії у пацієнтів, які не досягли задовільного ступеня терапевтичного патоморфозу на основі двофакторної логістичної моделі регресії яка враховує рівень Ki-67 та стромальних CD4+ лімфоцитів навколо резидуальної пухлини після НАХТ.

### **ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ**

1. Для покращення результатів лікування хворих з місцево поширеним РГЗ доцільно визначати поліморфізм гена CCR5(del32): прогнозується вища ефективність хіміотерапії у разі виявлення генотипу N/del32 за геном CCR5(del32).

2. Доцільно включення рівня FOXP3 + лімфоцитів у резидуальній пухлині у стандартні алгоритми стратифікації груп ризику, які включають визначення кількості уражених лімфовузлів, рівень Ki-67 та ОЖЗПТ після НАХТ.

3. У хворих, які не досягли задовільного ступеня патоморфозу після НАХТ, при виборі режиму ад'ювантної терапії рекомендовано: додатково до стандартних критеріїв оцінки факторів ризику визначати кількість стромальних CD4+ лімфоцитів та Ki-67 у резидуальній пухлині після завершення НАХТ та розраховувати критичний поріг тесту Ycrit. Застосування розробленої моделі прогнозування чутливості до хіміотерапії у пацієнтів, які не досягли задовільного ступеня терапевтичного патоморфозу після НАХТ оптимізує вибір режиму ад'ювантної хіміотерапії.

### **СПИСОК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**

1. Прогностичне значення біологічних маркерів при місцево-поширеному раку грудної залози / Л. А. Сивак, Н. О. Верьовкіна, С. А. Лялькін, Н. М. Майданевич, А. В. Аскольський, М. Ю. Кліманов, Н. В. Касап // Клин. Онкология. – 2015. – №4 (20). – С.69 – 71. *(Особистий внесок здобувача: аналіз прогностичного значення біологічних маркерів у хворих на місцево поширений РГЗ).*
2. Верьовкіна Н.О. Лімфоїдна інфільтрація та її вплив на ефективність передопераційної хіміотерапії при різних молекулярних підтипах місцево поширеного раку грудної залози / Н. О. Верьовкіна, Л. А. Сивак, М. С. Кротевич // Онкология. – 2017. – Т. 19, № 2 (72). – С.131–136. *(Особистий внесок здобувача: аналіз безпосередніх результатів НАХТ у хворих з місцево поширеним РГЗ з урахуванням параметрів імунного мікрооточення пухлини).*
3. Взаимосвязь полиморфизмов генов толл-подобных рецепторов и особенностей опухолевого микроокружения с эффективностью предоперационной химиотерапии при местнораспространенном раке молочной железы / Л. А. Сивак, Н. О. Веревкина, С. А. Лялькин, З. И. Россоха, Е. Ф. Попова // Евразийский онкол. журн. – 2017. – № 2 (5). – С. 206 –213. *(Особистий внесок здобувача: аналіз впливу поліморфізму генів тол подібних рецепторів на безпосередні результати НАХТ у хворих з місцево поширеним РГЗ).*

4. Вплив алельного поліморфізму гена CCR5 на перебіг місцево-поширеного раку грудної залози / Л. А. Сивак, Н. О. Верьовкіна, Н. Г. Горovenко, С. А. Лялькін, З. І. Россоха, О. Ф. Попова // *Клин. онкология* – 2017. – № 1 (25). – С. 51–54. (*Особистий внесок здобувача: аналіз впливу поліморфізму гена CCR5 на перебіг захворювання у хворих з місцево поширеним РГЗ*).
5. Імунна відповідь *in situ* після неоад'ювантної хіміотерапії у хворих на місцево поширений рак грудної залози / Н. О. Верьовкіна, Л. А. Сивак, С. А. Лялькін, М. С. Кротевич // *Клин. Онкология*. 2017. – № 3 (27). – С. 64 – 68. (*Особистий внесок здобувача: аналіз та узагальнення результатів лікування хворих з місцево поширеним РГЗ з урахуванням імунобіологічних маркерів прогнозу*).
6. Эффективность химиотерапии метастатического тройного негативного рака молочной железы: предварительные результаты рандомизированного исследования / С. А. Лялькин, Л. А. Сивак, И. И. Смоленка, Н. О. Веревкина // *Репродуктивное здоровье. Восточная Европа*. – 2017. – Т.7, № 4. – С.608 – 613. (*Особистий внесок здобувача: аналіз результатів лікування хворих з РГЗ*).
7. Покращення якості життя хворих на рак грудної залози, які отримують антрациклінвмісну поліхіміотерапію / А. В. Аскольський, Л. А. Сивак, Л.А. Шевчук, Н. М. Майданевич, Н.О. Верьовкіна // *Клин. онкология*. – 2017. – № 2 (26). – С. 51–55. (*Особистий внесок здобувача: аналіз результатів лікування хворих на РГЗ*).
8. Роль иммунного микроокружения в развитии рака молочной железы / Л. А. Сивак., А. Н. Грабовой, Н. О. Веревкина, С. А. Лялькин, Н. Н. Майданевич, А. В. Аскольський, М. Ю. Климанов // *Врачебное дело*. – 2017. – № 1 – 2 (1141). – С. 83 – 88 . (*Здобувачем проведено добір та аналіз наукової літератури, написання статті*).
9. Prognostic and predictive value of CD8 + , CD4 + infiltration and KI-67 level in the post-chemotherapy residual disease in triple negative breast cancer/ N. Verovkina, L.A. Syvak, S. Lyalkin, A. V. Askolskyu, M.Y. Klimanov, N.N. Maydanevych // *ESMO Symposium on Immuno-Oncology, 20 – 21 November, Lausanne, 2015 // Annals of Oncology* – 2015. – V. 26, Suppl. 8 P. 12 – 13.
10. Сивак Л. А. Значення біологічних маркерів при тричі негативному раку грудної залози. – Л. А. Сивак, Н. О. Веревкина // *Перспективи діагностики та лікування онкологічної патології : матеріали наук.-практ. конф. молодих вчених, 18 березня 2016 р., Київ*. – *Клин. онкология*. – 2016. – № 2 (22). – С. 75–76.
11. Прогностичне значення біологічних маркерів пухлинної тканини при місцево поширеному раку молочної залози / Л. А. Сивак, Н. О. Верьовкіна, С. А. Лялькін, Н. М. Майданевич, А. В. Аскольський, М. Ю. Кліманов, Н.В. Касап, О. М. Грабовий, М. С. Кротевич // *Персоніфікація лікування гормонзалежних пухлин : тези наук.-практ. конф. 15–16 жовтня 2015 р., Яремче*. – *Онкология*. – 2015. – Т.17, №3 (65). – С.195.

12. Значение биологических маркеров при трижды негативном раке молочной железы / Л. А. Сивак, Н. О. Веревкина, С. А. Лялькин, Н. Н. Майданевич, А. В. Аскольский, Н. В. Касап // XIII з'їзд онкологів та радіологів України: (матеріали з'їзду) 26–28 травня 2016 р., Київ. – Укр. Радіол. журн. – 2016. – Додаток 1. – С. 160–161.
13. The correlation between toll-like receptor genes polymorphisms, tumor microenvironment characteristics and the effectiveness of preoperative chemotherapy for locally advanced breast cancer / N. Verovkina, L. A. Sivak, S. A. Lyalkin, Z. I. Rossocha, E. P. Fedorova // ESMO 2017 Congress: abstr. book, Madrid, Spain, 08–12 September 2017 – Annals of Oncology. – 2017. – V. 28, suppl. 5. – P. 70.
14. Вплив поліморфізму гена CCR5 на ефективність передопераційної хіміотерапії при місцево-поширеному раку грудної залози з урахуванням особливостей мікрооточення / Л. А. Сивак, Н. О. Верьовкіна, С. А. Лялькін, Н. М. Майданевич, А. В. Аскольський, Т. Є. Тарасенко // Онкологія сьогодні: від діагностики до лікування : матеріали наук.-практ. конф. молодих вчених з міжнар. участю, 14 квітня 2017 р., Київ // Клин. Онкологія. – 2017. – № 3 (27). – С. 77.
15. Ефективність хіміотерапії у хворих на метастатичний тричі негативний рак грудної залози – попередні результати рандомізованого дослідження // Л. А. Сивак, С. А. Лялькін, Н. М. Майданевич, М. Ю. Кліманов, А. В. Аскольський, Н. В. Касап, Н. О. Верьовкіна // XIII з'їзд онкологів та радіологів України : (матеріали з'їзду) 26–28 травня 2016 р., Київ. – Укр. Радіол. журн. – 2016. – Додаток 1. – С. 161
16. Значение биологических маркеров при трижды негативном раке молочной железы / Л. А. Сивак, Н.О. Веревкина, С.А. Лялькин, Н.Н. Майданевич, А.В. Аскольський // IX з'їзд онкологів та радіологів країн СНД та Євразії : (матеріали з'їзду) 15–17 червня 2016 р., Мінськ, Республіка Білорусь. – Евразийский онкол. журн. – 2016. – №4. – С. 307.
17. Гастроінтестинальна токсичність хіміотерапії при лікуванні хворих на рак грудної залози / Л. А. Сивак, Н. М. Майданевич, С. А. Лялькін, А. В. Аскольський, Н. О. Верьовкіна, Н. В. Касап // XIII з'їзд онкологів та радіологів України : (матеріали з'їзду) 26–28 травня 2016 р., Київ. – Укр. Радіол. журн. – 2016. – Додаток 1. – С. 161–162.

## АНОТАЦІЯ

**Верьовкіна Н. О. Удосконалення лікування хворих на місцево поширений рак грудної залози з урахуванням імунобіологічних властивостей пухлини.** – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.01.07 – онкологія. – Національний інститут раку. Київ 2017.

Дисертацію присвячено оптимізації лікування хворих на місцево поширений рак грудної залози шляхом прогнозування чутливості до хіміотерапії з урахуванням імунобіологічних маркерів пухлинної тканини. Роботу виконано на підставі аналізу результатів лікування 111 хворих на рак грудної залози. Вивчені імунобіологічні особливості пухлин грудної залози різних молекулярних підтипів (інфільтрація пухлинної тканини CD4+, FOXP3+ та CD8+ лімфоцитами). Отримано нові наукові дані щодо прогностичного впливу інфільтрації стромы пухлинної тканини CD4+, CD8+ та FOXP3+ лімфоцитами на перебіг захворювання, результати лікування хворих на місцево поширений рак грудної залози. Визначено асоціацію поліморфізму генів CCR5, TLR-4 та TLR-2 з перебігом захворювання та ефективністю хіміотерапії у хворих на місцево поширений рак грудної залози. Вперше визначено імунобіологічні маркери пухлинної тканини (CD4+ лімфоцити та рівень Ki-67), за допомогою яких можна прогнозувати ефективність хіміотерапії у хворих на місцево поширений РГЗ та розроблено прогностичну модель визначення резистентності/чутливості до хіміотерапії. Уперше запропоновано модель прогнозування чутливості до ПХТ у хворих на місцево поширений РГЗ, які не досягли задовільного ступеня терапевтичного патоморфозу після НАХТ, та алгоритм вибору оптимального режиму АХТ.

**Ключові слова:** рак грудної залози, хіміотерапія, пухлина інфільтруючі лімфоцити, CD4+, FOXP3+ та CD8+ лімфоцити, поліморфізм генів CCR5, TLR-4 та TLR-2, прогноз.

## АННОТАЦИЯ

**Веревкина Н.О. Усовершенствование лечения больных местно распространенным раком молочной железы с учетом иммунобиологических свойств опухоли** – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.07 – онкология. – Национальный институт рака. Киев, 2017.

Диссертация посвящена оптимизации лечения больных местно распространенным раком молочной железы путем прогнозирования чувствительности/резистентности к химиотерапии, базируясь на особенностях иммунобиологических маркеров опухолевой ткани. Работа выполнена на основании анализа результатов лечения 111 больных раком молочной железы. Изучены иммунобиологические свойства опухолей молочной железы различных молекулярных подтипов (инфильтрация опухолевой ткани CD4+, FOXP3+ и CD8+ лимфоцитами). Получены новые научные данные о прогностическом влиянии инфильтрации стромы опухоли CD4+, CD8+ и

FOXP3+ лимфоцитами на течение заболевания, результаты лечения больных местно распространенным раком молочной железы. Определена взаимосвязь полиморфизма генов CCR5, TLR-4 и TLR-2 с течением заболевания и эффективностью химиотерапии у больных местно распространенным раком молочной железы. Впервые определены иммунобиологические маркеры опухолевой ткани (CD4+ лимфоциты и уровень Ki-67), с помощью которых можно прогнозировать эффективность химиотерапии у больных с местно распространенным раком молочной железы и разработана прогностическая модель определения резистентности/чувствительности к химиотерапии. Впервые предложен алгоритм прогнозирования чувствительности к ПХТ у больных местно распространенным раком молочной железы, не достигших удовлетворительной степени терапевтического патоморфоза после НАХТ, и выбора оптимального режима АХТ.

**Ключевые слова:** рак молочной железы, химиотерапия, опухоль инфильтрирующие лимфоциты, CD4+, FOXP3+ и CD8+ лимфоциты, полиморфизм генов CCR5, TLR-4 и TLR-2, прогноз.

#### **SUMMARY**

**Verovkina N.O. Optimization of treatment of patients with locally advanced breast cancer, with the consideration of the immunobiological properties of the tumor.** – As a manuscript.

The thesis for the Candidate of Medical Science degree in specialty 14.01.07 – Oncology. – National Cancer Institute. Kyiv, 2017.

The dissertation is devoted to treatment optimization of the patients with locally advanced breast cancer by predicting the sensitivity to chemotherapy on the basis of immunobiological markers of tumor tissue. Treatment results of 111 patients with locally advanced breast cancer were analyzed. Immunobiological features of breast tumors of various molecular subtypes (level of CD4+, FOXP3+ and CD8+ infiltration) have been studied. New data have been obtained regarding to the prognostic effect of the CD4+, CD8+ and FOXP3+ infiltration of the tumor tissue in the patients with locally advanced breast cancer. The strong correlation have been revealed between the CCR5, TLR-4 and TLR-2 genes polymorphism and the clinical features of the breast tumors and the effectiveness of the chemotherapy in patients with locally advanced breast cancer. For the first time the immunobiological markers of tumor tissue (CD4+ lymphocytes and level of Ki-67) were determined, with the help of which it is possible to predict the efficacy of chemotherapy in patients with locally advanced breast cancer and a prognostic model for determining resistance / sensitivity to chemotherapy was developed. For the first time, an application of the algorithm for predicting sensitivity to chemotherapy in patients with locally advanced breast cancer, who did not achieve a satisfactory level of the pathological response after NACHT, and the choice of the optimal AHT regimen was proposed.

**Key words:** breast cancer, chemotherapy, tumor infiltrating lymphocytes, CCR5, TLR-4 and TLR-2 gene polymorphism.

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

AT	– схема поліхіміотерапії (доксорубіцин, паклітаксел)
FAC	– схема поліхіміотерапії (фторурацил, доксорубіцин, циклофосфамід)
CCR5	– C-C chemokine receptor 5, C-C рецептор хемокіну 5
ER	– Estrogen Receptor
PR	– Progesteron Receptor
TLR	– Tol-like receptor, тол- подібні рецептори
AХТ	– ад'ювантна хіміотерапія
ВІ	– інтервал вірогідності
ВР	– відношення ризиків
ВШ	– відношення шансів
ЗВ	– загальна виживаність
БРВ	– безрецидивна виживаність
Лц	– лімфоцит
НАХТ	– неоад'ювантна хіміотерапія
ОЖЗПТ	– об'єм життєздатної залишкової пухлинної тканини
ПЛ	– пухлина інфільтруючі лімфоцити
РГЗ	– рак грудної залози