

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

ЛЯЛЬКІН СЕРГІЙ АНАТОЛІЙОВИЧ

УДК 618.19–006.6–036.2–097

**ОПТИМІЗАЦІЯ ХІМІОТЕРАПЕВТИЧНОГО ЛІКУВАННЯ ХВОРИХ
НА МЕТАСТАТИЧНИЙ ТРИЧІ НЕГАТИВНИЙ РАК ГРУДНОЇ ЗАЛОЗИ**

14.01.07 – онкологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора медичних наук

Київ – 2020

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Національному інституті раку МОЗ України

Науковий консультант доктор медичних наук, професор
Сивак Любов Андріївна,
Національний інститут раку,
завідувач науково-дослідного відділення
хіміотерапії солідних пухлин

Офіційні опоненти: доктор медичних наук, професор
Чешук Валерій Євгенович,
Національний медичний університет
імені О.О. Богомольця МОЗ України,
професор кафедри онкології

доктор медичних наук, професор,
Бондаренко Ігор Миколайович,
Дніпропетровська медична академія
МОЗ України, завідувач кафедри онкології
та медичної радіології

доктор медичних наук, професор
Бугайцов Сергій Георгійович,
ТОВ «Медичний центр
ім. академіка Юрія Прокопича Спіженко»,
завідуючий консультативним відділенням

Захист відбудеться «18» листопада 2020 року о 13 год 00 хв
на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.560.01
при 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 «15» жовтня 2020 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат медичних наук

Г. В. Лаврик

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. Рак грудної залози (РГЗ) – найпоширеніша онкологічна патологія серед жіночого населення. У структурі онкологічної захворюваності жінок в розвинутих країнах зляжкісні пухлини грудної залози посідають 1–2 місце, у 2018 р. в світі зареєстровано майже 2 млн нових випадків РГЗ (Bray F. et al., 2018). За даними Національного канцер-реєстру, у 2017 р. в Україні зареєстровано 14402 нових випадків захворювання, а померли від РГЗ 5851 жінок. Серед причин смертності жінок питома вага РГЗ найбільша і складає 23,5 % (Федоренко З.П. та співавт., 2019).

РГЗ є гетерогенним захворюванням. Молекулярно-генетична класифікація передбачає розподіл РГЗ на 4 основних підтипи (Perou S.M. et al., 2001), найбільш несприятливим з яких вважається базальноподібний, або РГЗ з тричі негативним фенотипом за даними імуногістохімічного дослідження, – тричі негативний РГЗ (Claire H. et al., 2019; Anders C.K. et al., 2016; Andre F. et al., 2013; Shah S. et al., 2012; Lin N.U. et al., 2008).

Тричі негативний РГЗ (ТНРГЗ) – це пухлина, яка не має рецепторів до естрогенів, прогестерону та для якої не характерна гіперекспресія HER2/neu. ТНРГЗ – це підтип, який асоційований із несприятливим прогнозом і високим ризиком швидкого рецидиву хвороби (до 80 % випадків впродовж 3 років після первинного комбінованого лікування), прогресуванням захворювання та смерті пацієнтки (Claire H. et al., 2019; Anders C.K. et al., 2016; Andre F. et al., 2013). Так, за даними Dent R. et al. (2007), ризик метастазування у пацієток з ТНРГЗ був у 2,6 раза вищим за інші підтипи (ВР 2,6; 95 % ВІ 2,0–3,5; $p < 0,0001$), а ризик смерті – в 3,2 раза (ВР 3,2; 95 % ВІ 2,3–4,5; $p < 0,001$) протягом 5 років після встановлення діагнозу. За даними (Claire H. et al., 2019; Awada A. et al., 2014; Isakoff S. et al., 2010; Kassam F. et al., 2009), медіана загальної виживаності (ЗВ) пацієток з метастатичним ТНРГЗ становить лише 12–18 міс.

Враховуючи відсутність специфічних мішеней, одним з основних методів лікування метастатичного ТНРГЗ є хіміотерапія (ХТ). Ефект цитостатиків як базового методу протипухлинного лікування ТНРГЗ, окрім прямої пошкоджуючої дії на ракові клітини, може бути пов'язаним із реалізацією різних імунологічних механізмів (Zitvogel L. et al., 2011). Незадовільні результати паліативного хіміотерапевтичного лікування пацієток зумовлені розвитком резистентності пухлини та токсичністю терапії (Livshits Z. et al., 2014; Isakoff S. et al., 2010). Обмеженість терапевтичних опцій, значний вплив ХТ на якість життя та відсутність стандартів у виборі схеми паліативної цитостатичної терапії диктують необхідність визначення більш чітких критеріїв вибору протоколів першої та наступних паліативних ліній ХТ при метастатичному ТНРГЗ.

Наразі в науковій літературі активно обговорюється можливість та доцільність включення імунологічних маркерів у рутинну клінічну практику для прогнозування перебігу захворювання та відповіді на терапію (Wang X. et al., 2019; Galon J. et al., 2014). У більшості випадків РГЗ не належить до високоімуногенних пухлин. Однак, ТНРГЗ, унаслідок геномної нестабільності, високого мутаційного навантаження, що призводить до утворення великої кількості неоантигенів, є найбільш імуногенним підтипом РГЗ (Vikas P. et al., 2018; Zehuan Li et al., 2018; Banerji S. et al., 2012).

В оцінці імунологічних маркерів при РГЗ на сьогодні найперспективнішими вважаються фактори, які можуть прогнозувати ефективність ХТ та перебіг захворювання при найбільш несприятливих підтипах РГЗ, а саме при ТНРГЗ. Loi S. et al. (2013) провели ретроспективне дослідження з метою оцінки прогностичного значення пухлина інфільтруючих лімфоцитів (ПЛ) при вперше діагностованому ТНРГЗ. Автори отримали попередні результати, які підтвердили статистично достовірний зв'язок між збільшенням рівня ПЛ і зниженням ризику рецидиву хвороби при ТНРГЗ (ВР 0,77; 95 % ВІ 0,61–0,98; $p = 0,02$).

Сучасний погляд на проблему ТНРГЗ базується на концепції його гетерогенності: усупереч негативному прогнозу в цілому для хворих на ТНРГЗ, існує підгрупа пацієток з більш вираженою відповіддю на поліхіміотерапію (ПХТ) та кращим прогнозом. Аналіз показників імунного мікрооточення пухлини, визначення їх прогностичного значення, дозволить виділити групу хворих на ТНРГЗ із відносно сприятливим перебігом хвороби. Ці дані дадуть можливість здійснювати відбір хворих для застосування імунотерапії та комбінувати її із стандартними методами протипухлинної терапії (хіміотерапією).

Сучасна імунотерапія передбачає застосування моноклональних антитіл, так званих інгібіторів контрольних точок (checkpoint inhibitors), а також клітинної імунотерапії, до якої відносять протипухлинні вакцини (Лежнин Ю.Н. и соавт., 2018; Wang Z.X. et al., 2014). Протипухлинні вакцини застосовують для стимуляції імунної системи проти пухлина специфічних антигенів в основному за рахунок активації цитотоксичних Т-лімфоцитів; з-поміж таких перспективними є аутологічні дендритноклітинні вакцини (ДКВ) (Melero I. et al., 2018; Храмовская Н.Н. и соавт., 2014).

Таким чином, підвищення ефективності лікування хворих на метастатичний ТНРГЗ залишається одним з найбільш актуальних завдань сучасної онкології. На сьогодні цитостатична терапія є основним і практично єдиним методом системного лікування ТНРГЗ. Принципи максимальної індивідуалізації терапії РГЗ, що активно впроваджуються останніми роками, для даного підтипу не є успішними. Дотепер у світі не існує стандартних схем ХТ метастатичного ТНРГЗ, а результати лікування є незадовільними. Отже, існує гостра потреба в пошуку нових підходів з метою підвищення ефективності лікування цієї прогностично несприятливої групи хворих.

Зв'язок роботи з науковими програмами, темами, планами.
Дисертаційна робота виконана за планом науково-дослідних робіт

Національного інституту раку: «Розробити терапію супроводу хіміотерапевтичного лікування хворих на злоякісні пухлини молочної залози з урахуванням клініко-лабораторних факторів прогнозу токсичності» (номер державної реєстрації 0111U000377; шифр теми ВН. 14.01.07.131-11; 2011–2013 рр.), «Оптимізувати лікування хворих на «тричі негативний» метастатичний рак грудної залози» (номер державної реєстрації 0114U001063, шифр теми ВН.14.01.07.152-14; 2014–2016 рр.) та «Оптимізувати тактику лікування хворих на метастатичний рак грудної залози прогностично несприятливих молекулярних підтипів» (номер державної реєстрації 0117U000407, шифр теми ВН. 14.01.07.173-17; 2017–2019 рр.).

Мета дослідження: підвищити ефективність лікування хворих на тричі негативний рак грудної залози шляхом оптимізації хіміотерапевтичного лікування з урахуванням біологічних характеристик пухлини, впровадження клітинної імунотерапії.

Завдання дослідження:

1. Вивчити морфологічні та імуногістохімічні особливості тричі негативного раку грудної залози (ступінь диференціювання G, індекс проліферативної активності Ki-67, ступінь інфільтрації стромі та паренхіми пухлини ПЛЛ, FOXP3+, CD4+, CD8+ лімфоцитами), оцінити їх вплив на перебіг захворювання та ефективність хіміотерапії.

2. Дослідити предиктивну роль пухлина інфільтруючих лімфоцитів та їх субпопуляцій у стромі та паренхімі пухлини у хворих на тричі негативний рак грудної залози при проведенні неоад'ювантної хіміотерапії.

3. Провести дослідження мутацій генів BRCA 1, 2 і рівня рецепторів андрогенів у хворих на тричі негативний рак грудної залози та з'ясувати їх вплив на перебіг захворювання та ефективність хіміотерапії.

4. Визначити молекулярно-генетичні особливості тричі негативного раку грудної залози (рівень експресії інтерсектину-2, поліморфізм генів TLR4, TLR2 та TLR9), з'ясувати їх вплив на перебіг захворювання та ефективність хіміотерапії.

5. Оцінити та порівняти безпосередню та віддалену ефективність першої лінії лікування за стандартними схемами хіміотерапії TP (паклітаксел-карбоплатин) або AT (доксорубіцин-паклітаксел) у хворих на метастатичний тричі негативний рак грудної залози на основі рандомізованого дослідження.

6. Оцінити та порівняти безпосередню та віддалену ефективність другої лінії лікування за стандартними схемами монохіміотерапії (гемцитабін, вінорельбін, капецитабін) у хворих на метастатичний тричі негативний рак грудної залози на основі рандомізованого дослідження.

7. Розробити клінічний протокол застосування дендритноклітинної вакцини у хворих на метастатичний тричі негативний рак грудної залози в комбінації зі стандартною хіміотерапією.

8. Оцінити безпосередню та віддалену ефективність, а також токсичність лікування у пацієнток, які отримали дендритноклітинну вакцину в комбінації зі стандартною хіміотерапією.

9. Розробити алгоритм лікування хворих на метастатичний тричі негативний рак грудної залози.

Об'єкт дослідження: тричі негативний рак грудної залози.

Предмет дослідження: безпосередні та віддалені результати лікування хворих на метастатичний тричі негативний рак грудної залози.

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

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше досліджено вплив імунобіологічних показників (ПЛ, FOXP3+, CD4+, CD8+) на перебіг тричі негативного раку грудної залози.

Вперше науково обґрунтовано, що високий рівень FOXP3+ лімфоцитів в імунному інфільтраті на момент встановлення діагнозу свідчить про зниження імовірності рецидиву ТНРГЗ (ВР 0,66; 95 % ВІ 0,50–0,88; $p = 0,005$), а високий рівень ПЛ та FOXP3+ лімфоцитів – про зниження ризику смерті у хворих на ТНРГЗ (ВР 0,61; 95 % ВІ 0,45–0,82; $p = 0,001$ та ВР 0,54; 95 % ВІ 0,37–0,80; $p = 0,002$ відповідно).

Вперше встановлено динаміку змін імунобіологічних показників у стромі та паренхімі пухлини під впливом хіміотерапії. Вперше визначено, що у пацієток з ТНРГЗ, які отримували неоад'ювантну поліхіміотерапію (НПХТ), виявлено статистично достовірне підвищення стромальних CD8+ лімфоцитів після завершення НПХТ ($p = 0,01$), що може свідчити про здатність хіміотерапії підвищувати імуногенність ТНРГЗ.

Вперше визначено зв'язок імунобіологічних маркерів у стромі та паренхімі пухлини з ефективністю хіміотерапії при ТНРГЗ. Вперше розроблено логістичну модель прогнозування ризику недосягнення повної морфологічної відповіді після НПХТ серед хворих на ТНРГЗ, яка враховує рівень стромальних CD4+ лімфоцитів та рівень ПЛ.

Вперше виявлено незалежне прогностичне значення імунобіологічних маркерів пухлини у пацієток з ТНРГЗ, у яких не було отримано повної морфологічної відповіді після НПХТ. Встановлено, що збільшення кількості стромальних та інтратуморальних CD8+ лімфоцитів у резидуальній пухлині після НПХТ зменшує ризик смерті від ТНРГЗ: ВР 0,6 (95 % ВІ 0,5–0,9; $p = 0,01$) та ВР 0,6 (95 % ВІ 0,4–0,9; $p = 0,008$) на кожен градацію відповідно.

Вперше науково доведено незалежне прогностичне значення експресії андрогенних рецепторів (АР) у пацієток з ТНРГЗ.

Вперше оцінено та порівняно безпосередню та віддалену ефективність першої лінії лікування за стандартними схемами хіміотерапії (ТР і АТ) у хворих на метастатичний ТНРГЗ на основі рандомізованого дослідження. Статистично достовірної різниці медіан тривалості відповіді на лікування та виживаності без прогресування в обох групах не встановлено.

Вперше науково обґрунтовано, що в другій лінії паліативної хіміотерапії найбільш ефективними є схеми із використанням монотерапії вінорельбіном та гемцитабіном порівняно з капецитабіном.

Вперше розроблено клінічний протокол застосування дендритноклітинної вакцини у хворих на метастатичний ТНРГЗ в комбінації з хіміотерапією

(вінорельбін) у другій лінії лікування, застосування якого дозволило підвищити медіану виживаності без прогресування у хворих більш ніж на 2 міс. ($p = 0,045$).

Практичне значення отриманих результатів. Розроблено логістичну модель прогнозування ризику недосягнення повної морфологічної відповіді після НПХТ у хворих на ТНРГЗ (прогностичну модель визначення чутливості до хіміотерапії), яка враховує рівень стромальних CD4+ лімфоцитів та рівень ПЛЛ.

Впроваджено клінічний протокол використання дендритноклітинної вакцини у хворих на метастатичний ТНРГЗ в комбінації з хіміотерапією (вінорельбін) в другій лінії лікування.

Визначено фактори потенційної ефективності імунотерапії: високий рівень ПЛЛ та FOXP3+ в матеріалі трепанобіопсії, співвідношення CD8+ високі / FOXP3+ низькі або CD8+ високі / FOXP3+ високі, позитивний статус AP, досягнення pCR при НПХТ, високий рівень CD8+ в резидуальній пухлині після НПХТ.

Розроблено алгоритм лікування хворих на метастатичний тричі негативний рак грудної залози.

Впровадження результатів дослідження. Матеріали дисертаційної роботи впроваджено в практичну діяльність: КНП «Київський міський клінічний онкологічний центр», КНП КОР «Київський обласний онкологічний диспансер», Інституту клінічної радіології ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини» НАМН України, КП «Полтавський обласний клінічний онкологічний диспансер Полтавської обласної ради», КНП «Черкаський обласний онкологічний диспансер Черкаської обласної ради», що підтверджено відповідними актами.

Особистий внесок здобувача. Дисертація є самостійним закінченим науковим дослідженням здобувача. Автором визначено об'єкт, мету і завдання дослідження; розроблено його основні теоретичні і практичні положення. Проведено патентно-інформаційний пошук, аналіз вітчизняних та зарубіжних публікацій з проблеми.

Здобувач брав безпосередню участь у розробці клінічного протоколу використання дендритноклітинної вакцини у хворих на метастатичний ТНРГЗ в комбінації з хіміотерапією (вінорельбін) у другій лінії лікування. Проводив клінічне обстеження хворих, аналіз ефективності та безпеки лікування. Проводив стаціонарну хіміотерапію хворим на всіх трьох етапах дослідження, введення дендритноклітинної вакцини. Автором проаналізовано та узагальнено результати лікування, створено комп'ютерну базу даних, виконано статистичну обробку, сформульовано висновки та практичні рекомендації.

В опублікованих наукових роботах за темою дисертації, виконаних в співавторстві, відсутній конфлікт інтересів, не використані матеріали захищеної кандидатської дисертації.

Апробація результатів. Основні положення дисертації обговорювалися на: XIII з'їзді онкологів та радіологів України (Київ, 2016); IX съезде онкологів и радиологов стран СНГ и Евразии (Минск, 2016); III Петербургском международном онкологическом форуме «Белые ночи 2017» (Санкт-Петербург,

2017); V Національному конгресі «Людина та ліки – Україна» (Київ, 2012); VII (Київ, 2018) та V (Київ, 2016) Міжнародних медичних конгресах «Впровадження сучасних досягнень медичної науки в практику охорони здоров'я України»; конгресах ESMO 2018 (Munich, 2018), ESMO 2017 (Madrid, 2017) ESMO 2015 (Vienna, 2015); науково-практичній конференції з міжнародною участю «Ukrainian oncology and reconstructive surgery conference» (Київ, 2019); науково-практичних конференціях для молодих вчених «Сучасна онкологія: діагностика та лікування» (Київ, 2015), «Перспективи діагностики та лікування онкологічної патології» (Київ, 2016), присвяченої 100-річчю Національного інституту раку та Всесвітньому дню боротьби з раком «World Cancer Day 2020» (Київ, 2020); науково-практичних конференціях «Персоніфікація лікування гормонозалежних пухлин» (Яремче, 2015), «Сучасні підходи до профілактики, діагностики та лікування злоякісних пухлин» (Київ, 2017), «Сучасні аспекти лікування прогностично несприятливих форм раку грудної залози» (Київ, 2018); науково-практичних семінарах «Онкологічна допомога: можливості і переваги мультидисциплінарного підходу» (Херсон, 2017), «Сучасні можливості, проблеми і перспективи онкологічної допомоги» (Херсон, 2016), «Паліативна допомога в онкології» (Київ, 2015).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 48 наукових праць, які повністю відображають її зміст: 32 статті (4 – у виданнях, що індексуються у наукометричній базі Scopus; 8 – у міжнародних); 14 – тези вітчизняних та міжнародних конференцій, конгресів та з'їздів; отримано 2 патенти України на корисну модель.

Обсяг та структура дисертації. Дисертація викладена на 366 сторінках машинопису; складається з анотацій, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів, 5 розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів, висновків, практичних рекомендацій, списку з 396 використаних джерел (69 – кирилицею та 327 – латиницею), додатків; ілюстрована 105 таблицями і 59 рисунками.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи дослідження. Роботу проведено на базі відділення хіміотерапії солідних пухлин Національного інституту раку. Дослідження складалося з 3 основних етапів. Усі пацієнтки надали письмову інформовану згоду на участь у дослідженні.

Програма наукового дослідження схвалена комісією з питань етики Національного інституту раку (протокол № 68 від 21.05.2015 р. та № 150 від 19.11.2019 р.).

На **першому етапі** проведено одноцентрове відкрите рандомізоване дослідження із залученням 122 хворих на метастатичний ТНРГЗ, порівняно ефективність та безпеку першої паліативної лінії ХТ. Основну групу 1 склали 59 хворих на метастатичний ТНРГЗ, які отримали ПХТ за схемою АТ (доксорубіцин – 60 мг/м², паклітаксел – 175 мг/м²). В основну групу 2 входило

63 хворих, у яких застосовано ПХТ за схемою TP (паклітаксел – 175 мг/м², карбоплатин – АUC 5).

Усім хворим було виконано стандартний алгоритм обстеження, який включав комп'ютерну томографію (КТ) органів грудної порожнини (ОГП), органів черевної порожнини (ОЧП) та малого таза з контрастним підсиленням з метою оцінки розповсюдженості процесу та об'єктивної оцінки відповіді пухлини на хіміотерапевтичне лікування згідно з критеріями RECIST 1.1. Оцінку токсичності ХТ проводили за критеріями токсичності (Common Toxicity Criteria NCI V.4.0).

Ефективність ПХТ оцінювали після кожних 2-х курсів ХТ. Усі пацієнтки отримали від 2-х до 6-ти циклів паліативної ХТ першої лінії. Терапію продовжували до моменту виявлення прогресування захворювання за критеріями RECIST 1.1 або появи непереносимої токсичності.

Морфологічні та імуногістохімічні (ІГХ) дослідження проводили в патологоанатомічному відділенні Національного інституту раку (зав. – канд. мед. наук Кротевич М.С.) Морфологічне дослідження проводили за стандартною методикою. В матеріалі трепанобіопсії та післяопераційному матеріалі пухлини грудної залози визначали стандартні показники: гістологічний тип пухлини, ступінь диференціювання G, рецептори ER, PR, онкопротеїн HER-2/neu, підтверджуючи тричі негативний статус, а також індекс проліферативної активності Ki-67.

ІГХ дослідження молекулярних маркерів пухлинних клітин здійснювали з використанням таких моноклональних антитіл (МкАТ): Estrogen Receptor α – (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), CD4+ лімфоцити – МоHu anti CD4 T-Cell- Clone MT310, CD8+ лімфоцити – МоHu anti-CD8, T-Cell Clone C8/144B (Dako, Данія), FOXP3+ лімфоцити – FOXP3 (клон 5H5L12, «Invitrogen», США). Застосовано систему візуалізації з використанням системи детекції En Vision TM FLEX (Dako, Данія). Результати ІГХ реакції оцінювали напівкількісним методом, за допомогою підрахунку кількості позитивно забарвлених клітин – індекс мітки у відсотках.

В матеріалі трепанобіопсії та післяопераційному матеріалі визначали ПЛІ у стромі пухлини, субпопуляції: CD4+, CD8+ та FOXP3+ лімфоцити визначали в стромі пухлини (стромальні CD4+, CD8+ та FOXP3+) та в зоні пухлинних клітин (інтратуморальні CD4+, CD8+). Кількість CD4+, CD8+ та FOXP3+ лімфоцитів аналізували в препаратах, забарвлених гематоксиліном та еозином, оцінювали у 10 полях зору та визначали у відсотках наступним чином: відсутня (0), слабо виражена (+) < 10 %, помірна (++) – 10–30 % та висока (+++) – > 30 %.

Повна морфологічна відповідь (pCR) визначалась як відсутність клітин інфільтративного раку в пухлині грудної залози і в лімфовузлах.

Дослідження AP проводили з використанням МкАТ: Androgen Receptor Mouse Monoclonal Antibody, Clone FR441DBS, США. Для детекції зазначеного білка використовували систему візуалізації En Vision TM FLEX (Dako, Данія). Позитивними вважали пухлини, у яких було виявлено експресію AP більше, ніж у 10 % пухлинних клітин.

Молекулярно-генетичні дослідження проводили в науково-дослідній лабораторії експериментальної онкології Національного інституту раку (зав. – д-р біол. наук Храновська Н.М.).

Всім хворим одноразово проводили забір 5,0 мл периферичної крові для молекулярно-генетичного дослідження.

Визначення поліморфізму генів TLR2 (G753A), TLR4 (C399T) та TLR9 (G2848A) виконували за методом полімеразної ланцюгової реакції з аналізом поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів (ПЛР – ПДРФ). Геномну ДНК виділяли з периферичної крові за допомогою комерційної тест-системи Nucleo Spin® Blood Quick Pure (Macherey-Nagel, Німеччина) відповідно до інструкції виробника. Необхідні фрагменти генів TLR2 (rs5743708), TLR4 (rs4986791) та TLR9 (rs352140) ампліфікували за допомогою комерційного набору TaqMan Universal PCR MasterMix (Thermo Scientific, США) з використанням специфічних олігонуклеотидних праймерів. Продукти ампліфікації ділянок генів TLR2, TLR4 та TLR9 підлягали гідролітичному розщепленню за допомогою ендонуклеаз рестрикції Acil, HinfI та BstUI (Thermo Scientific, США) відповідно. Рестрикційні фрагменти генів TLR2, TLR4 та TLR9 аналізували в 3 % агарозному гелі (Cleaver Scientific, Великобританія) з додаванням бромистого етидію (Thermo Scientific, США).

Дослідження мутації в генах BRCA 1, 2 визначали методом кількісної ПЛР з детекцією результатів в режимі реального часу на приладі 7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, США) з використанням специфічних праймерів та асиметричного ціанінового катіонного флюорохрому SYBR Green (C32H37N4S+) з піком поглинання $\lambda_{\max} = 488$ нм та флюоресценції $\lambda_{\max} = 522$ нм. Послідовності праймерів були підібрані із застосуванням програми Primer Express® Software v3.0 фірми Applied Biosystems та синтезовані фірмою Applied Biosystems (США).

На **другому етапі** проведено одноцентрове відкрите рандомізоване дослідження з включенням 87 хворих на метастатичний ТНРГЗ, які спрогресували на хіміотерапії першої лінії. Основну групу 1 склали 29 хворих на метастатичний ТНРГЗ, які отримали монохіміотерапію за схемою вінорельбін – 25 мг/м² щотижнево. В основну групу 2 входило 29 хворих, які отримали монохіміотерапію за схемою гемцитабін – 1000 мг/м² 1, 8 та 15 день 28-денного циклу. В основну групу 3 входило 29 хворих, які отримали монохіміотерапію за схемою капецитабін – 1000 мг/м² 2 рази на добу 1–14 день 21-денного циклу.

Алгоритм обстеження, оцінка ефективності та токсичності були аналогічними, як для хворих першого етапу дослідження.

На **третьому етапі** проведено дослідження ефективності та безпеки ДКВ в комбінації зі стандартною ХТ (вінорельбіном) у хворих на метастатичний

ТНРГЗ, які раніше отримали одну лінію ХТ з приводу метастатичного захворювання. Дослідження відкрите нерандомізоване, залучено 54 пацієнтки. В основну групу включено 25 пацієнок з метастатичним ТНРГЗ, які отримали ДКВ в комбінації з вінорельбіном. ДКВ вводилась внутрішньошкірно, всього 5 введень з інтервалом в 1 міс. (1 курс), вінорельбін 25 мг/м² щотижнево. Основним критерієм включення в дослідження була наявність факторів потенційної ефективності імунотерапії (мінімум одного з факторів): високий рівень ПЛЛ, високий рівень FOXP3+, співвідношення CD8+ високі / FOXP3+ низькі або CD8+ високі / FOXP3+ високі, AP позитивний статус, досягнення рCR при НПХТ, високі CD8+ в резидуальній пухлині. В контрольну групу увійшли 29 хворих, які отримали монохіміотерапію за схемою вінорельбін як другу лінії ХТ метастатичного ТНРГЗ (група 1 із другого етапу дослідження).

Алгоритм обстеження, оцінка ефективності та токсичності були аналогічними, як для хворих першого та другого етапів дослідження.

ДКВ виготовляли в науково-дослідній лабораторії експериментальної онкології Національного інституту раку (зав. – д-р біол. наук Храновська Н.М.).

ДКВ представляє собою аутологічні зрілі дендритні клітини (ДК) моноцитарного походження, які активовані («навантажені пухлинними антигенами») в присутності лізату пухлинних клітин лінії ТНРГЗ MDA-MB-231. При розробці технології отримання дендритних клітин з моноцитів периферичної крові хворих на ТНРГЗ основний акцент був зроблений на оптимізації процесу їх дозрівання, оскільки ступінь зрілості визначає протипухлинну ефективність вакцини. Зрілість ДКВ досягається використанням додаткових стимулів дозрівання – інтерферону- α та агоністів Toll-like рецепторів (TLR) LPS з *E.coli*, поєднане застосування яких сприяє посиленню Т-хелпер 1 спрямованого дозрівання мієлоїдних дендритних клітин.

Математична (статистична) обробка даних виконана із застосуванням стандартних статистичних пакетів STATISTICA 10.0 та MedStat. Для первинної обробки таблиць та попередніх розрахунків використали пакет програм Excel. Розбіжності вважали достовірними при $p < 0,05$. Для всіх вибірок аналізувалась відповідність емпіричних розподілів нормальному закону розподілення Гауса за критерієм χ^2 -Пірсона. Для порівняння величин вибірових дисперсій двох незалежних вибірок використовували параметричний критерій Фішера. Для порівняння середніх значень в багатьох групах застосовували однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA).

При перевірці гіпотези про наявність зв'язку між результуючою та факторною ознакою, за умови, якщо результуюча змінна не підпорядковується нормальному закону розподілу, використовували методи непараметричного факторного аналізу. З цією метою використовували критерій Крускала Уолліса.

Для визначення сили кореляційного зв'язку між ознаками застосовували ранговий коефіцієнт кореляції Спірмена, для оцінки ступеня зв'язку – коефіцієнт Крамера.

Для визначення форми залежності між кількісними ознаками використовували регресійний аналіз. Для виявлення впливу факторної ознаки при порівнянні цензурованих даних проводили стратифікацію досліджуваної

когорти за методом Каплана–Майєра. Для порівняння кривих виживаності використовували логранговий критерій.

Для прогнозування ризику рецидиву хвороби чи смерті від ТНРГЗ застосовували моделі пропорційних ризиків Кокса. Співвідношення ризиків (hazard ratio) розраховано з 95 % інтервалом вірогідності (ВІ).

Для визначення ризику виникнення рецидиву в певні строки після завершення лікування, прогнозування чутливості до хіміотерапії використано метод ROC-аналізу (*receiver operating characteristic*).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Оцінка прогностичної ролі пухлина інфільтруючих лімфоцитів при ТНРГЗ. Проаналізовано вплив імунобіологічних показників на безрецидивну виживаність хворих (БРВ) на ТНРГЗ із використанням методу побудови багатофакторних моделей Кокса. Як факторні ознаки використано 18 показників: вік хворих, статус менструальної функції, стадія хвороби: розмір первинної пухлини (pT за TNM), наявність або відсутність ураження регіонарних лімфатичних вузлів (pN за TNM), ступінь диференціювання пухлини (G), рівень ПЛЛ, рівень стромальних CD4+, CD8+ та FOXP3+ лімфоцитів до та після операції, рівень інтратуморальних CD4+, CD8+ лімфоцитів до та після операції, індекс проліферативної активності Ki-67 в матеріалі трепанобіопсії та в післяопераційному матеріалі.

Після відбору ознак залишилося 2 значимих фактори: FOXP3+ та інтратуморальні CD4+ лімфоцити в матеріалі трепанобіопсії.

Проведений аналіз свідчить, що при стандартизації за іншими факторами, ризик рецидиву хвороби у пацієток з ТНРГЗ пов'язаний, в основному, з двома факторами: рівнем інтратуморальних CD4+ лімфоцитів та FOXP3+ регуляторних лімфоцитів у імунному інфільтраті на момент встановлення діагнозу (в матеріалі трепанобіопсії). Виявлено, що високий рівень інтратуморальних CD4+ лімфоцитів (CD4-T) підвищує ризик метастазування у хворих на ТНРГЗ в середньому в 1,73 раза (ВР 1,73; 95 % ВІ = 1,27–2,37; $p < 0,001$). Натомість, високий рівень FOXP3+ лімфоцитів в імунному інфільтраті на момент встановлення діагнозу свідчить про зниження імовірності рецидиву хвороби (ВР 0,66; 95 % ВІ = 0,50–0,88; $p = 0,005$) (табл. 1).

Таблиця 1

Прогностична роль рівня пухлина інфільтруючих лімфоцитів у розвитку рецидивів хвороби у пацієток з ТНРГЗ (багатофакторна модель пропорційних ризиків Кокса)

Субпопуляція ПЛЛ	Коефіцієнт моделі, $b \pm m$	p	Показник відношення ризику, ВР (95 % ВІ)	Прогноз рецидиву
CD4-T	0,55 ± 0,16	0,001	1,73 (1,27–2,37)	↑
FOXP3+	-0,41 ± 0,15	0,005	0,66 (0,50–0,88)	↓

Оцінено вплив аналогічних імунобіологічних показників на загальну виживаність (ЗВ) хворих на ТНРГЗ за методом побудови багатофакторних моделей Кокса. Після відбору ознак залишилося 3 значимих фактори: рівень ПЛЛ, FOXP3+ та CD4-T на момент встановлення діагнозу (табл. 2).

Таблиця 2

Значимі факторні ознаки, пов'язані з ризиком смерті у хворих на ТНРГЗ (багатофакторна модель пропорційних інтенсивностей Кокса)

Субпопуляція ПЛЛ	Коефіцієнт моделі, $b \pm m$	p	Показник відношення ризику, ВР (95 % ВІ)	Ризик смерті від ТНРГЗ
CD4-T	0,56 ± 0,21	0,008	1,76 (1,16–2,66)	↑
FOXP3+	-0,61 ± 0,20	0,002	0,54 (0,37–0,80)	↓
ПЛЛ	-0,50 ± 0,16	0,001	0,61 (0,45–0,82)	↓

Проведений аналіз свідчить, що при стандартизації за іншими факторами, ризик смерті у хворих на ТНРГЗ пов'язаний, в основному, з трьома факторами: рівнями ПЛЛ, CD4-T та FOXP3+ лімфоцитів в імунному інфільтраті на момент встановлення діагнозу. Виявлено, що високий рівень CD4-T підвищує ризик смерті від ТНРГЗ в середньому в 1,76 раза (ВР 1,76; 95 % ВІ 1,16–2,66; $p = 0,008$).

Проте, високий рівень ПЛЛ та FOXP3+ лімфоцитів в імунному інфільтраті на момент встановлення діагнозу свідчить про зниження ризику смерті у хворих на ТНРГЗ (ВР 0,61; 95 % ВІ 0,45–0,82; $p = 0,001$ та ВР 0,54; 95 % ВІ 0,37–0,80; $p = 0,002$ відповідно).

Проаналізовано прогностичне значення співвідношення стромальних та інтратуморальних CD4+ та CD8+ лімфоцитів, а також співвідношення CD8+ та FOXP3+ лімфоцитів в матеріалі трепанобіопсії та в післяопераційному матеріалі хворих на ТНРГЗ. Досліджено, що ризик смерті від ТНРГЗ не відрізнявся у пацієнток з різним співвідношенням пухлина інфільтруючих CD4+ та CD8+ лімфоцитів. За показником співвідношення CD8+/ FOXP3+ усіх пацієнток розподілено на 4 підгрупи: 1 підгрупа – CD8+ високий / FOXP3+ високий, 2 підгрупа – CD8+ низький / FOXP3+ високий; 3 підгрупа – CD8+ високий / FOXP3+ низький; 4 підгрупа – CD8+ низький / FOXP3+ низький. При аналізі показників ЗВ у хворих на ТНРГЗ виявлено статистично достовірну різницю між підгрупами залежно від співвідношення регуляторних FOXP3+ та CD8+ лімфоцитів (стромальних та інтратуморальних) на момент встановлення діагнозу. Так, медіана ЗВ у пацієнток з ТНРГЗ на момент встановлення діагнозу становила 48 міс. (95 % ВІ 36–85 міс.) у підгрупі стромальних CD8+ високі / FOXP3+ високі, у підгрупі – CD8+ низькі / FOXP3+ високі – 22 міс. (95 % ВІ 13–51 міс.), тоді як у підгрупі CD8+ високі / FOXP3+ низькі вона склала 52 міс. (95 % ВІ 24–100 міс.), а в підгрупі із співвідношенням CD8+ низькі / FOXP3+ низькі медіана ЗВ склала 24 міс. (95 % ВІ 17–29 міс.) (рис. 1).

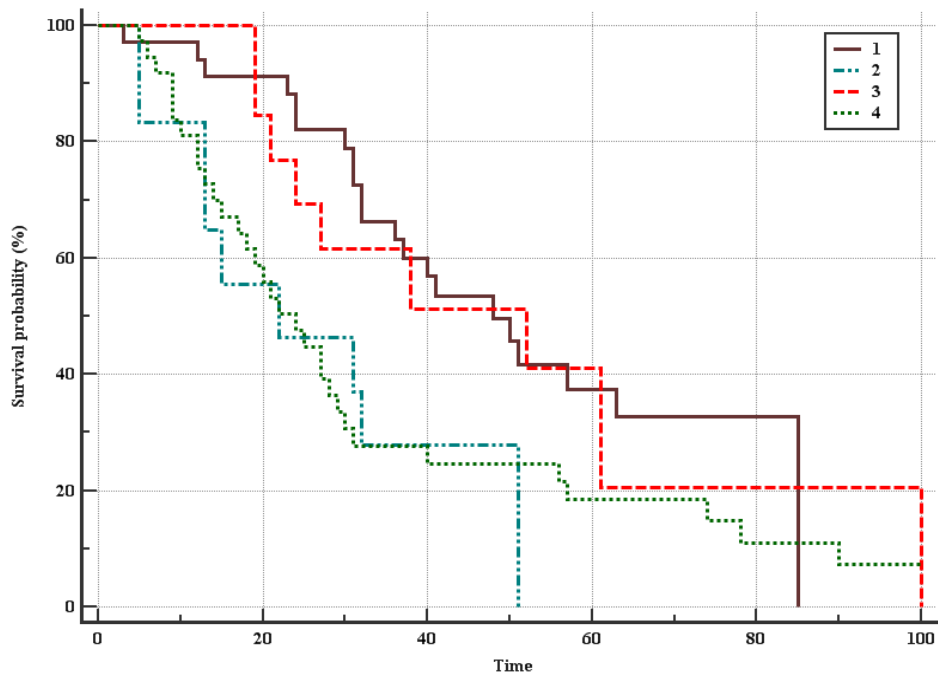


Рис. 1. Загальна виживаність у хворих на ТНРГЗ залежно від співвідношення стромальних CD8+ / FOXP3+ лімфоцитів. Підгрупа 1 – CD8+ високі / FOXP3+ високі, підгрупа 2 – CD8+ низькі / FOXP3+ високі, підгрупа 3 – CD8+ високі / FOXP3+ низькі, підгрупа 4 – CD8+ низькі / FOXP3+ низькі; Log-Rank Test, $p = 0,02$

Також виявлено, що ризик смерті від ТНРГЗ у пацієток із співвідношенням стромальних лімфоцитів CD8+ низькі / FOXP3+ низькі був вищим майже удвічі порівняно з хворими із співвідношенням лімфоцитів CD8+ високі / FOXP3+ високі, $BP = 1,99$ (ВІ 95 %, 1,17–3,41), ($\chi^2 = 9,6$ при 3 ступенях свободи; $p = 0,02$).

Аналогічні закономірності виявлені при дослідженні впливу співвідношення інтратуморальних CD8+ та FOXP3+ лімфоцитів. Медіана ЗВ у пацієток з ТНРГЗ становила 41 міс. (95 % ВІ 32–63 міс.) у підгрупі – CD8+ високі / FOXP3+ високі; у підгрупі – CD8+ низькі / FOXP3+ високі – 27 міс. (95 % ВІ 13–40 міс.), тоді як у підгрупі CD8+ високі / FOXP3+ низькі вона склала 52 міс. (95 % ВІ 19–100 міс.), а в підгрупі із співвідношенням CD8+ низькі / FOXP3+ низькі медіана ЗВ склала 22 міс. (95 % ВІ 15–30 міс.) (рис. 2).

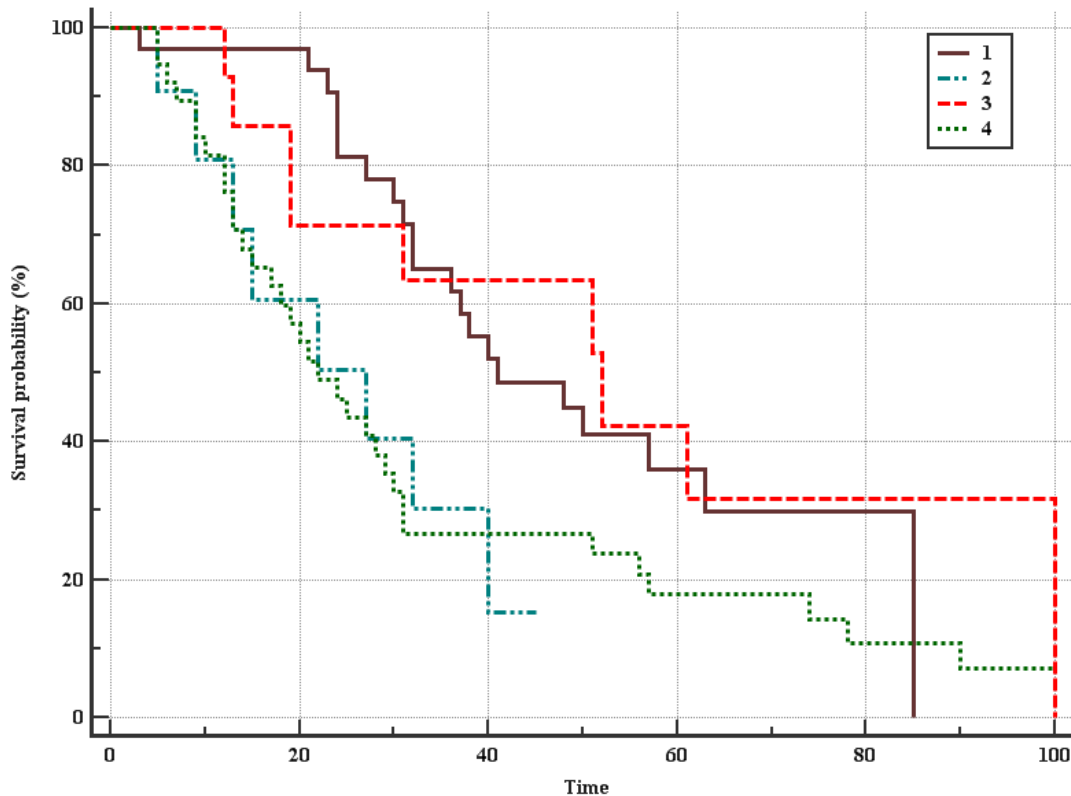


Рис. 2. Загальна виживаність у хворих на ТНРГЗ залежно від співвідношення інтратуморальних CD8+ / FOXP3+ лімфоцитів. Підгрупа 1 – CD8+ високі / FOXP3+ високі, підгрупа 2 – CD8+ низькі / FOXP3+ високі, підгрупа 3 – CD8+ високі / FOXP3+ низькі, підгрупа 4 – CD8+ низькі / FOXP3+ низькі; Log-Rank Test, $p = 0,02$

Також виявлено, що ризик смерті від ТНРГЗ у пацієток із співвідношенням інтратуморальних лімфоцитів CD8+ низькі / FOXP3+ низькі був вищим у 1,92 раза порівняно з хворими із співвідношенням лімфоцитів CD8+ високі / FOXP3+ високі, $BP = 1,92$ (ВІ 95 %, 1,12–3,30), ($\chi^2 = 9,3$ при 3 ступенях свободи; $p = 0,02$).

Оцінка впливу хіміотерапії на динаміку змін субпопуляцій пухлина інфільтруючих лімфоцитів у хворих на ТНРГЗ. Із включених у дослідження 122 хворих на ТНРГЗ, 52 пацієтки в анамнезі отримували НПХТ згідно з існуючими стандартами із використанням антрацикліновмісних схем (доксорубіцин + циклофосфамід або доксорубіцин + циклофосфамід + фторурацил). Після НПХТ пацієткам проведено оперативне лікування в обсязі радикальної мастектомії або квадрантектомії із регіонарною лімфодисекцією. Досліджували зміни рівня ПЛЛ та їх субпопуляцій у пацієток на момент встановлення діагнозу в матеріалі трепанобіопсії та в післяопераційному матеріалі. На першому етапі зміни ПЛЛ вивчали у двох групах: у групі хворих, які не отримували НПХТ ($n=46$), і окремо – у пацієток, які отримували НПХТ ($n = 52$). В результаті не виявлено статистично достовірних відмінностей в обох групах хворих при дослідженні динаміки змін стромальних CD4+ лімфоцитів,

інтратуморальних CD8+ та FOXP3+ лімфоцитів. Проте, у пацієток з ТНРГЗ, які отримували НПХТ, виявлено статистично достовірне підвищення стромальних CD8+ лімфоцитів після завершення НПХТ ($p = 0,01$), а от у пацієток, які не отримували НПХТ, не виявлено статистично достовірних змін рівня стромальних CD8+ лімфоцитів ($p = 0,97$). Результати свідчать про здатність ХТ підвищувати імуногенність ТНРГЗ (вірогідно, в результаті утворення великої кількості неоантигенів внаслідок загибелі пухлинних клітин), що є підставою для комбінації хіміотерапії з імунотерапією та успішності подібних досліджень (рис. 3).

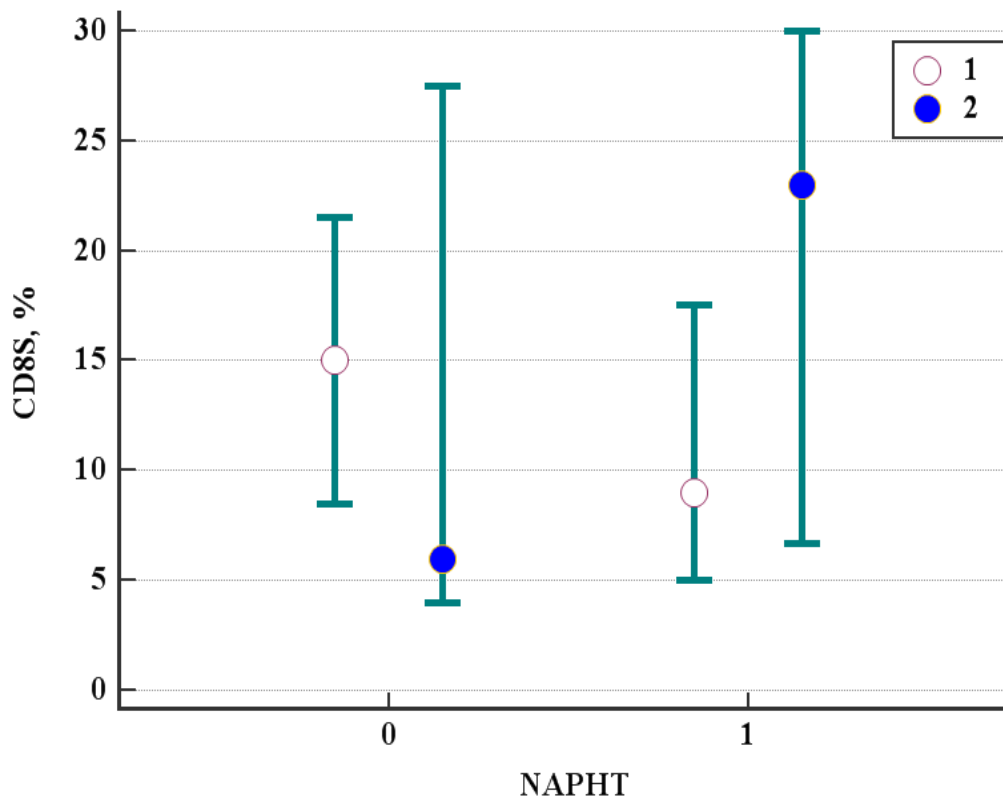


Рис. 3. Динаміка зміни показника стромальних CD8+ лімфоцитів: 1 – до операції, 2 – після операції у пацієток з ТНРГЗ без НПХТ (група «0») та у групі, які отримували НПХТ (група «1»). Указане медіанне значення

Прогностична роль пухлина інфільтруючих лімфоцитів у хворих на ТНРГЗ залежно від відповіді на хіміотерапію. Для оцінки впливу рівня досягнутого терапевтичного патоморфозу на БРВ та ЗВ, був проведений аналіз результатів лікування хворих на ТНРГЗ, шляхом побудови однофакторних моделей пропорційних інтенсивностей Кокса.

Аналіз результатів лікування пацієток з тричі негативним раком грудної залози виявив, що відсутність повної патоморфологічної відповіді пухлини після НПХТ збільшує ризик рецидиву хвороби в середньому в 2,9 раза, ВР 2,9 (95 % ВІ 1,4–6,1; $p = 0,005$) порівняно з хворими, у яких було досягнуто рCR після НПХТ (рис. 4).

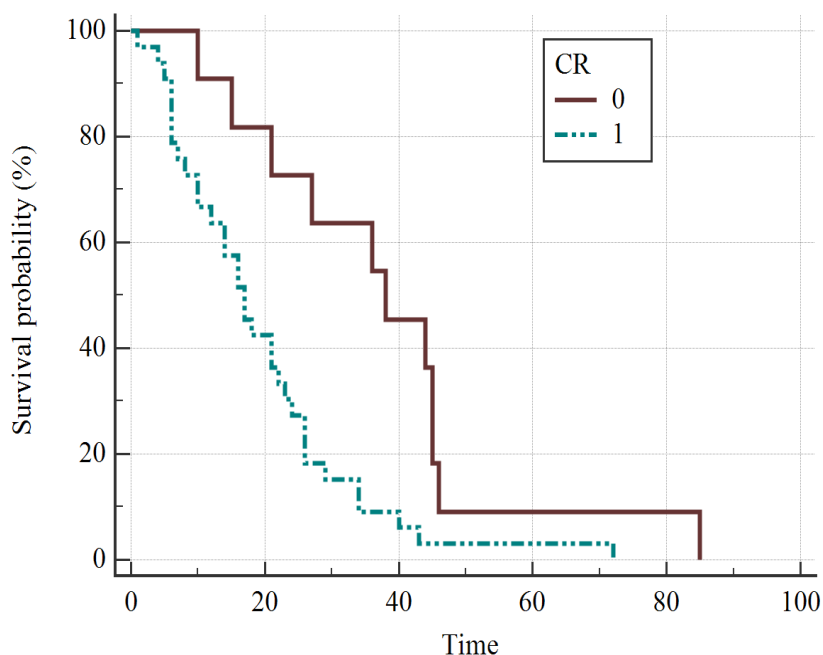


Рис. 4. Криві безрецидивної виживаності у хворих на ТНРГЗ залежно від відповіді пухлини на НПХТ. 0 – pCR, 1 – non-pCR; Log-rank test, $p = 0,0032$

Як видно з рисунка 4, медіана БРВ становила 38 міс. (95 % ВІ 21–45 міс.) для хворих на ТНРГЗ, у яких досягнута pCR після НПХТ. Для пацієток групи non-pCR медіана БРВ становила лише 17 міс. (95 % ВІ 12–22 міс.); $p = 0,0032$.

Також було виявлено (рис. 5), що наявність резидуальної пухлини у хворих на ТНРГЗ після НПХТ збільшує ризик смерті від цього захворювання у 2,7 раза (95 % ВІ 1,0–7,1; $p = 0,05$). Медіана ЗВ становила становила 61 міс. (95 % ВІ 49–100 міс.) для хворих на ТНРГЗ, у яких досягнута pCR після НПХТ. Для пацієток групи non-pCR медіана ЗВ становила лише 32 міс. (95 % ВІ 30–45 міс.); $p = 0,039$.

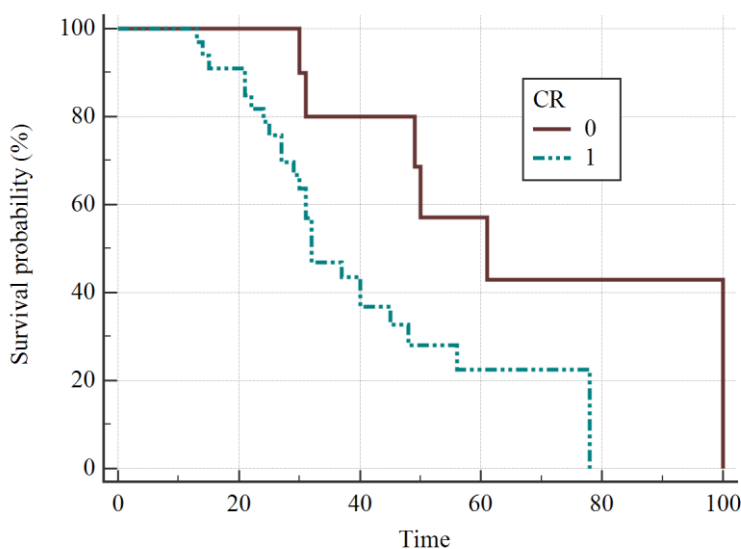


Рис. 5. Криві загальної виживаності у хворих на ТНРГЗ залежно від відповіді пухлини на НПХТ. 0 – pCR, 1 – non-pCR; Log-rank test, $p = 0,039$

Було вивчено прогностичне значення імунобіологічних маркерів пухлини у пацієток з ТНРГЗ після завершення НПХТ. Визначено, що у пацієток з повною морфологічною відповіддю (pCR) пухлини після НПХТ не виявлено незалежного прогностичного впливу імунобіологічних показників. Натомість, у пацієток з ТНРГЗ, у яких не отримано повної морфологічної відповіді після НПХТ (група non-pCR), було виявлено незалежне прогностичне значення імунобіологічних маркерів. Так, підвищення стромальних та інтратуморальних CD8+ лімфоцитів у резидуальній пухлині після НПХТ зменшує ризик смерті від ТНРГЗ, ВР 0,6 (95 % ВІ 0,5–0,9; $p = 0,01$) та ВР 0,6 (95 % ВІ 0,4–0,9; $p = 0,008$) на кожну градацію відповідно (табл. 3).

Таблиця 3

Зв'язок факторних ознак із загальним виживанням у хворих на ТНРГЗ після завершення НПХТ у групі non-pCR (однофакторні моделі Кокса)

Показник	Коефіцієнт моделі, $b \pm m$	p	Показник відношення ризиків, ВР (95 % ВІ)
CD4+T	$-0,64 \pm 0,33$	0,05	0,5 (0,3–1,0)
CD8+S	$-0,44 \pm 0,18$	0,01	0,6 (0,5–0,9)
CD8+T	$-0,51 \pm 0,19$	0,008	0,6 (0,4–0,9)
Ki-67	$0,0013 \pm 0,0009$	0,16	1,01 (0,99–1,03)
FOXP3+	$0,01 \pm 0,16$	0,94	1,01 (0,75–1,37)

Прогнозування ефективності хіміотерапії у хворих на ТНРГЗ. Прогнозування ефективності НПХТ у хворих на ТНРГЗ проводили за методами математичного моделювання та побудови логістичних моделей регресії. При проведенні аналізу зв'язку імунобіологічних маркерів пухлини, визначених у матеріалі трепанобіопсії перед початком лікування, з ефективністю НПХТ результат вважався негативним ($Y = 1$, для 39 пацієток) у випадку, коли не було досягнуто повного терапевтичного патоморфозу (non-pCR), у разі досягнення pCR – результат лікування вважався позитивним ($Y = 0$, для 13 пацієток).

Для виявлення сукупності факторних ознак, що пов'язані з ризиком недосягнення pCR, використано метод побудови багатофакторних логістичних моделей регресії. Після відбору залишилося 2 значимі факторні ознаки: рівень стромальних CD4+ лімфоцитів та рівень ПЛ. Модель, побудована на обраних факторних ознаках, адекватна ($\chi^2=15,5$ при $p < 0,001$).

На рисунку 6 наведено криву операційних характеристик моделі.

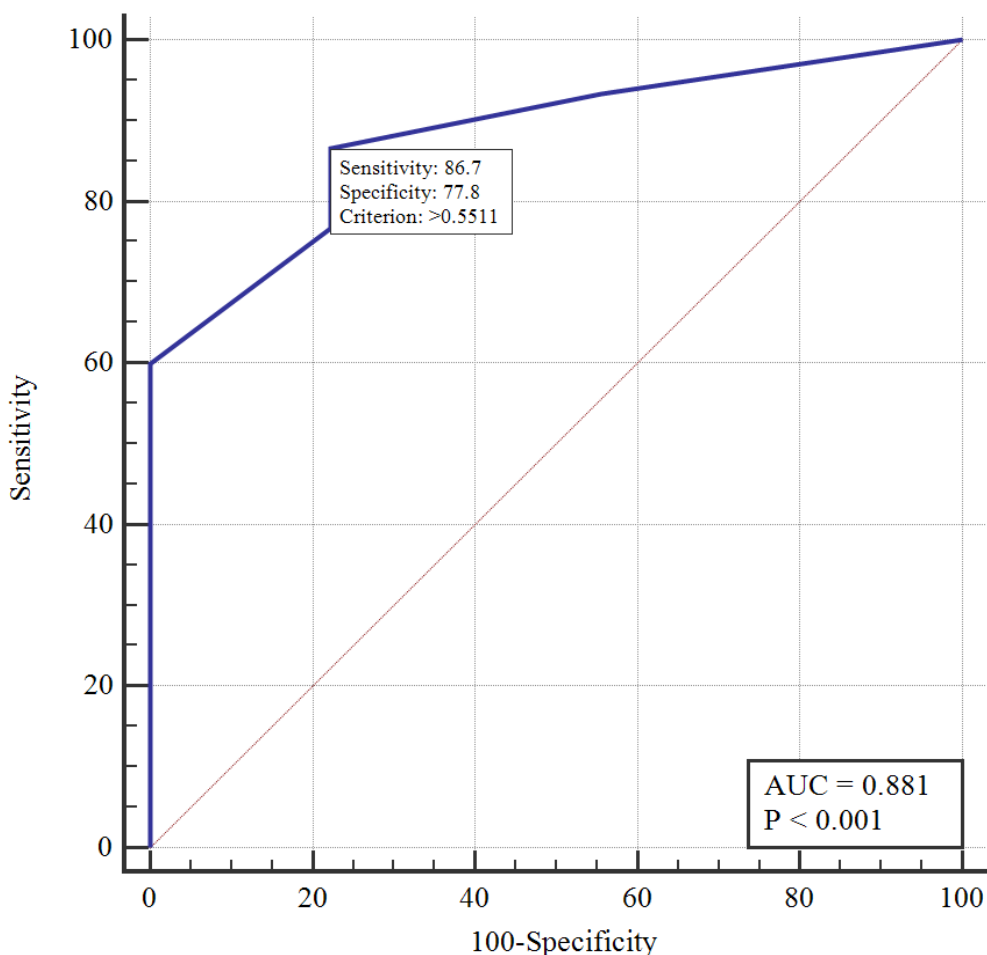


Рис. 6. ROC-крива двофакторної логістичної моделі прогнозування ризику недосягнення повної морфологічної відповіді

Площа під кривою моделі $AUC = 0,88$ (95 % ВІ 0,74–0,96), що свідчить про сильний зв'язок рівня стромальних CD4+ лімфоцитів та ПЛ із ризиком недосягнення рCR. При виборі оптимального порогу моделі її чутливість становить 86,7 % (95 % ВІ 69,3–96,2), специфічність – 77,8 % (95 % ВІ 40,0–97,2), прогностичність позитивного тесту – 92,9 % (95 % ВІ 79,2–97,8), прогностичність негативного тесту – 63,6 % (95 % ВІ 39,7–82,3), що свідчить про доволі високі її прогностичні характеристики. В таблиці 4 наведені коефіцієнти двофакторної логістичної моделі прогнозування.

Таблиця 4

Значимі факторні ознаки, пов'язані з ризиком недосягнення повної відповіді (двофакторна логістична модель регресії)

Факторна ознака	Коефіцієнт моделі, $b \pm m$	p	Показник відношення шансів (ВШ) (95 % ВІ)
CD4+стромальні	$-1,23 \pm 0,71$	0,09	0,3 (0,1–1,2)
ПЛ	$-2,62 \pm 1,03$	0,01	0,07 (0,01–0,55)

Проведений аналіз свідчить про наявність кореляції між ефективністю НПХТ та факторними ознаками: рівнем стромальних CD4+ лімфоцитів та рівнем ПІЛ у матеріалі трепанобіопсії до початку НПХТ. Встановлено, що при підвищенні рівня ПІЛ ризик недосягнення повного лікувального патоморфозу зменшується ($p = 0,01$), ВШ = 0,07 (95 % ВІ 0,01–0,55) на кожну градацію підвищення показника (при стандартизації за рівнем стромальних CD4+ лімфоцитів).

Критичний поріг тесту $Y_{crit} = 0,551$ (при $Y < Y_{crit}$ прогнозується досягнення задовільного результату, при $Y \geq Y_{crit}$ – відповідно незадовільного).

Для практичного застосування модель реалізовано у Excel (CR.xls). На рисунку 7 представлено інтерфейс системи прогнозування.

	A	B	G	H	I	J	K
1							
2	CD4-S=	1		Y=	0.55	Прогноз сприятливий	
3	TIL=	3					
4							

Рис. 7. Інтерфейс системи прогнозування ризику недосягнення повної морфологічної відповіді

Для використання моделі необхідно ввести показники пацієнтки у відповідні комірки та натиснути «Enter» для проведення розрахунку.

Особливості поліморфізму генів TLR-2, TLR-4, TLR-9 та мутації гена BRCA1 у хворих на ТНПГЗ. При вивченні розповсюдженості поліморфізмів генів тол-подібних рецепторів другого, четвертого та дев'ятого типів було виявлено генотип GA за геном TLR-2 (G753A) у 33 (33 %), генотип AA – у 7 (7 %), а генотип GG – у 60 (60 %) пацієнток; генотип CC за геном TLR-4 (C399T) у 71 (70,3 %) пацієнтки, генотип CT – у 25 (24,8 %), а генотип TT по гену TLR-4 (C399T) – у 5 (5 %) пацієнток. При вивченні поліморфізму гена TLR-9 (G2848A) виявлено генотип GA у 50 (49,5 %) пацієнток; генотип AA – у 37 (36,6 %), а генотип GG – у 14 (13,9 %) пацієнток з метастатичним ТНПГЗ.

Мутація гена BRCA1 виявлена у 18 (15,8 %) хворих на ТНПГЗ. При цьому, найпоширенішою мутацією в гені BRCA1 була 5382InsC, яка виявлена у 14 пацієнток (77,8 %). У 3 хворих визначена мутація 185delAG (16,7 %), ще в 1 – 300T>G (5,6 %). В жодній пацієнтки не виявлено мутації в гені BRCA2. Досліджено, що мутація за геном BRCA1 частіше зустрічалась у молодих пацієнток в пременопаузі. Так, середній вік пацієнток носіїв мутації за геном BRCA1 склав $(42,6 \pm 7,8)$ років проти $(53,4 \pm 8,6)$ років у пацієнток з відсутністю мутації ($p < 0,001$).

Встановлено, що частота об'єктивної відповіді серед хворих на метастатичний ТНРГЗ, які отримали першу паліативну лінію ПХТ, становила 61,45 % серед пацієнток без мутації гена BRCA1 та 61,11 % – з мутацією гена BRCA1; не виявлено статистично достовірної різниці між групами ($p = 0,95$). У пацієнток, які отримали другу паліативну лінію ХТ, частота контролю над захворюванням (часткова відповідь + стабілізація) склала 75,36 % у пацієнток без BRCA1 мутації і була вищою порівняно з 61,5 % у пацієнток з мутацією в гені BRCA1; однак, статистично достовірної різниці також не виявлено ($p = 0,32$).

Проведений аналіз не виявив статистично достовірної різниці ефективності першої та другої паліативної лінії хіміотерапії у хворих на ТНРГЗ залежно від поліморфізмів генів TLR-2 (G753A), TLR-4 (C399T) та TLR-9 (G2848A).

За допомогою однофакторного дисперсійного аналізу доведено асоціацію поліморфізму гена TLR-4 (C399T) та рівня проліферативної активності пухлини Ki-67 у післяопераційному матеріалі хворих на ТНРГЗ ($p = 0,02$). Виявлено асоціацію поліморфізму гена TLR-2 (G753A) з рівнем ПЛ у пацієнток з метастатичним ТНРГЗ ($p = 0,02$).

Виявлено достовірний вплив поліморфізму гена TLR-4 (C399T) на показники безрецидивної виживаності (БРВ) у хворих на ТНРГЗ (табл. 5). У пацієнток з ТНРГЗ, носіїв генотипу СС за геном TLR-4 (C399T), ризик рецидиву захворювання був нижчий у 3,6 раза, $BP = 0,28$ (95 % ВІ 0,10–0,80) порівняно з носіями генотипу ТТ за цим геном.

Таблиця 5

Прогнозування безрецидивної виживаності у хворих на ТНРГЗ залежно від поліморфізму гена TLR-4 (C399T)

Показник	Коефіцієнт моделі, $b \pm m$	p	Показник відношення ризиків, ВР (95 % ВІ)
Ген TLR4 (C399T) СС та ТТ	-1,2540	0,01	0,28 (0,10–0,80)
Ген TLR4 (C399T) СТ та ТТ	-1,3984	0,01	0,24 (0,08–0,74)

Також виявлено зменшення ризику розвитку віддалених метастазів у носіїв генотипу СТ за геном TLR-4 (C399T), $BP = 0,24$ (ВІ 95 %; 0,08–0,74) у 4 рази порівняно з хворими, носіями генотипу ТТ за геном TLR-4 (C399T).

Проведений аналіз не виявив незалежного прогностичного впливу поліморфізму генів TLR-2 (G753A), TLR-9 (G2848A) та мутації гена BRCA1 на показники БРВ та ЗВ у хворих на ТНРГЗ. Також не виявлено незалежного прогностичного впливу поліморфізму гена TLR-4 (C399T) на показники ЗВ.

Андрогенні рецептори та їх роль у перебігу та прогнозі ТНРГЗ.

Проведено дослідження експресії андрогенних рецепторів (АР) в пухлинній тканині у 116 хворих на ТНРГЗ. Позитивну експресію (АР+) було виявлено у 44 (38 %) хворих, тоді як у решти 72 (62 %) – експресії АР не виявлено (АР-). Пухлини з позитивною експресією АР частіше зустрічались у пацієнок старшого віку. Середній вік хворих на ТНРГЗ без експресії АР склав $(49,5 \pm 9,7)$ років, а пацієнок, в пухлинах яких було виявлено експресію АР, – $(56,1 \pm 7,5)$ років; відмінність між групами є статистично значимою, $p=0,002$.

Виявлена закономірність підтверджується також при проведенні кореляційного аналізу. У нашому дослідженні виявлено прямий кореляційний зв'язок між віком пацієнок та експресією АР (Spearman's rho = 0,357; 95 % ВІ 0,186–0,507; $p=0,0001$).

У хворих на ТНРГЗ позитивна експресія АР в пухлині частіше зустрічалась у пацієнок в менопаузі. Так, у групі АР(+) хворих 86,4 % пацієнок знаходились у менопаузі, а у 13,6 % пацієнок менструальна функція була збережена, порівняно з групою АР(-) хворих, у якій 51,4 % пацієнок знаходились в пременопаузі та 48,6 % – в менопаузі ($p=0,001$).

Досліджено безпосередній вплив експресії АР на ЗВ хворих на ТНРГЗ за допомогою методу Каплана–Майєра (рис. 8).

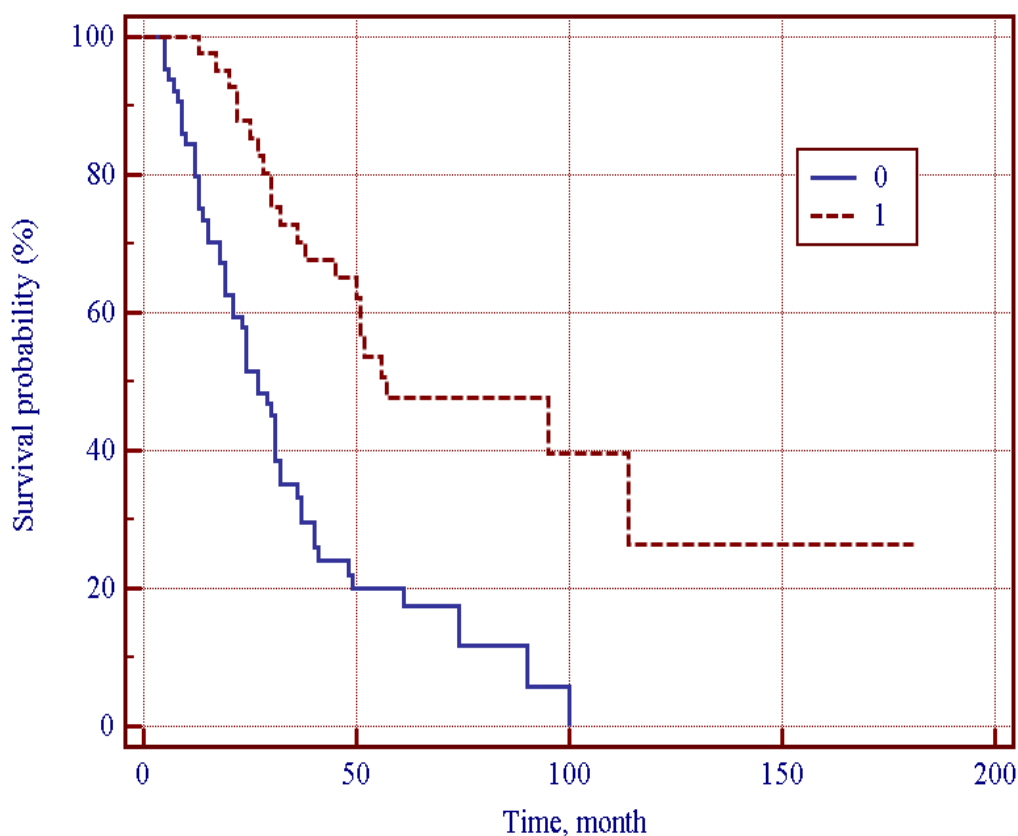


Рис. 8. Загальна виживаність у хворих на ТНРГЗ. Група 0 – відсутня експресія АР(-), група 1 – наявна експресія АР(+); Log-Rank Test, $p < 0,0001$

Результати показують вплив експресії AP на виживаність хворих на ТНРГЗ з рівнем статистичної значимості за Log-Rank критерієм $p < 0,0001$. Медіана ЗВ пацієток з ТНРГЗ становила 57 міс. у AP позитивних хворих та 27 міс. – у AP негативних.

Визначено, що п'ятирічна виживаність з моменту встановлення діагнозу у хворих з експресією AP(+) була вищою порівняно з пацієтками без експресії AP(-), і становила ($47,6 \pm 8,3 \%$) та ($20,0 \pm 5,3 \%$) відповідно ($p < 0,05$).

Проведена оцінка прогностичної ролі стадії захворювання та експресії AP (табл. 6).

Таблиця 6

Прогностична роль стадії захворювання та експресії AP у хворих на ТНРГЗ (двофакторна модель пропорційних ризиків Кокса)

Факторна ознака	Коефіцієнт моделі b	p	Показник відношення ризику, ВР (95 % ВІ)
Експресія AP	-1,0636	0,0001	0,35 (0,20–0,57)
Стадія TNM	0,4025	<0,0001	1,49 (1,25–1,77)

Аналіз двофакторної моделі пропорційних ризиків Кокса у нестратифікованій групі показав, що виявлення захворювання у більш пізній стадії підвищує ризик смерті майже в 1,5 раза (ВР 1,49; 95 % ВІ 1,25–1,77), $p < 0,0001$, на кожен градацію. Проте, наявність експресії AP на пухлинних клітинах пацієток з ТНРГЗ знижує ризик смерті в середньому в 3 рази (ВР 0,35; 95 % ВІ 0,20–0,57), $p = 0,0001$.

Вивчено вплив експресії AP на безпосередні та віддалені результати лікування хворих на метастатичний тричі негативний рак грудної залози, які отримали першу та другу паліативну лінію ПХТ, у відкритому рандомізованому дослідженні.

Встановлено, що частота об'єктивної відповіді серед пацієток з метастатичним ТНРГЗ, які отримали першу паліативну лінію ПХТ, становила 56,9 % у AP(-) та 63,6 % – у AP(+) хворих. Ця різниця не є статистично достовірною ($p = 0,72$).

Встановлено, що медіана виживаності без прогресування хворих на метастатичний ТНРГЗ, які отримували першу паліативну лінію ПХТ, становила 8 міс. у групі AP позитивних та 7 міс. – у AP негативних, достовірно не відрізнялись, $p = 0,27$ (рис. 9).

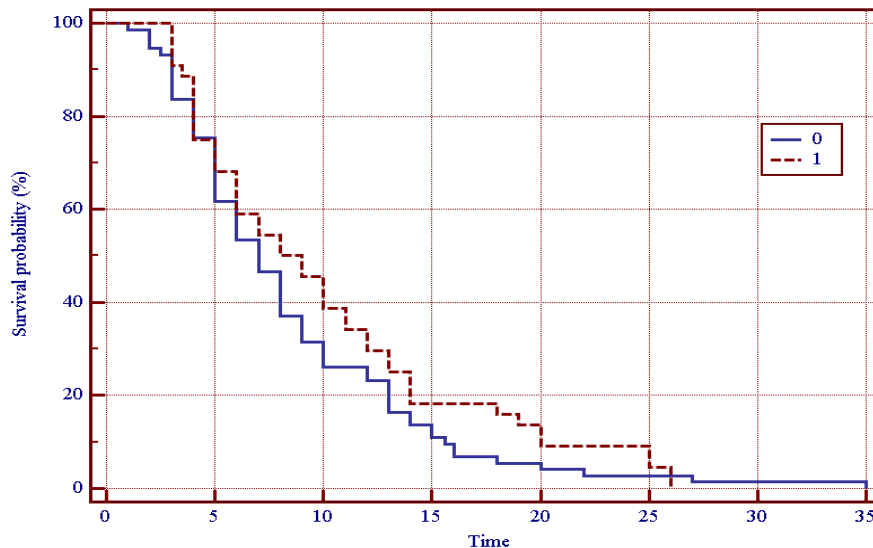


Рис. 9. Виживаність без прогресування у хворих на ТНРГЗ, які отримали першу паліативну лінію ПХТ. Група 0 – відсутня експресія AP(-), група 1 – наявна експресія AP(+); Log-Rank Test, $p = 0,27$

При проведенні аналізу не виявлено статистично значимої різниці в безпосередній ефективності схем другої лінії ХТ залежно від експресії AP. Частота контролю над захворюванням (часткова відповідь + стабілізація) становила 71,1 % у AP(-) хворих та 76,92 % у AP(+), $p = 0,48$. Визначено достовірний вплив експресії AP на виживаність без прогресування у хворих на метастатичний ТНРГЗ, які отримали другу паліативну лінію ХТ, методом Каплана–Майєра (рис. 10).

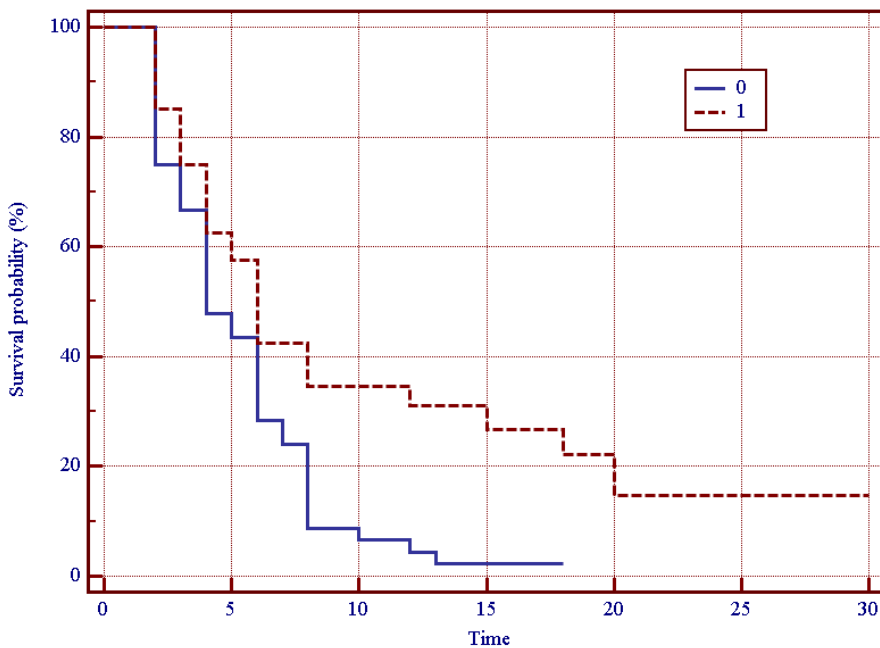


Рис. 10. Виживаність без прогресування у хворих на ТНРГЗ. Група 0 – відсутня експресія AP(-), група 1 – наявна експресія AP(+); Log-Rank Test, $p = 0,0045$

Медіана виживаності без прогресування становила 6 міс. для AP(+) хворих та 4 міс. – для AP(-).

Вивчено вплив експресії AP на ЗВ хворих на метастатичний ТНРГЗ, які отримали другу паліативну лінію ХТ (рис. 11).

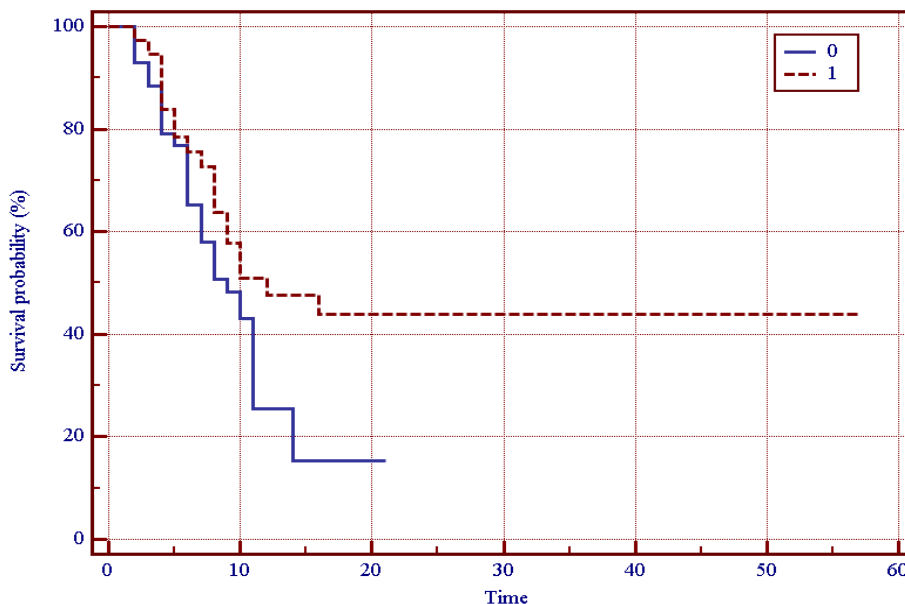


Рис. 11. Загальна виживаність у хворих на ТНРГЗ. Група 0 – відсутня експресія AP(-), група 1 – наявна експресія AP(+); Log-Rank Test, $p = 0,04$

Було виявлено вплив експресії AP на ЗВ хворих на метастатичний ТНРГЗ, які отримували другу паліативну лінію хіміотерапії, з рівнем статистичної значимості за Log-Rank критерієм, $p = 0,04$. Медіана ЗВ становила 12 міс. У AP(+) пацієнток та лише 9 міс. – у AP(-) хворих. Варто зазначити, що однорічна ЗВ у групі з наявною експресією AP(+) становила $(47,6 \pm 8,7) \%$, проте у групі AP(-) – лише $(25,4 \pm 6,9) \%$.

Аналіз безпосередніх та віддалених результатів хіміотерапевтичного лікування хворих на метастатичний ТНРГЗ. При аналізі ефективності першої лінії ПХТ у хворих на метастатичний ТНРГЗ виявлено, що серед 59 пацієнток основної групи 1 у 6 (10,2 %) хворих зареєстровано повну відповідь, у 28 (47,5 %) – часткову відповідь, у 18 (30,5 %) пацієнток – стабілізацію процесу, а у 7 (11,9 %) – прогресування захворювання. Серед 63 пацієнток основної групи 2 у 5 (7,9 %) пацієнток зареєстровано повну відповідь, у 34 (54 %) – часткову відповідь, у 14 (22,2 %) пацієнток – стабілізацію процесу, а у 10 (15,9 %) – прогресування захворювання.

Частота об'єктивної відповіді склала 57,7 % у пацієнток, які отримали першу паліативну лінію ПХТ за протоколом АТ, та 61,9 % у пацієнток, які отримали ПХТ за протоколом ТР; статистично достовірної різниці між групами за частотою об'єктивної відповіді не виявлено ($p = 0,71$).

Аналіз показників виживаності без прогресування не показав статистично значимих відмінностей між двома групами ($p = 0,85$ за логранговим критерієм).

На рисунку 12 представлено криві виживаності без прогресування у пацієток з метастатичним ТНРГЗ залежно від схеми ПХТ (метод Каплана–Майєра).

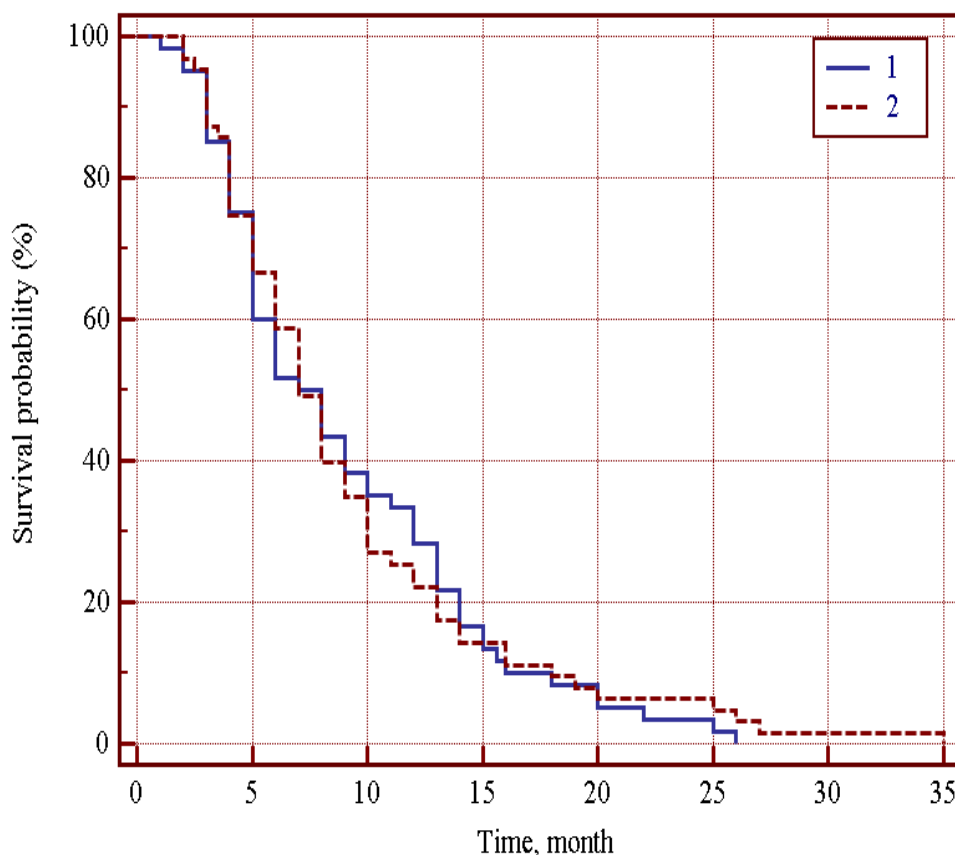


Рис. 12. Виживаність без прогресування у хворих на метастатичний ТНРГЗ. Група 1 – схема АТ, група 2 – схема ТР; Log-RankTest, $p = 0,85$

Так, медіана виживаності без прогресування у пацієток з метастатичним ТНРГЗ після першої паліативної лінії ПХТ склала 7 міс. (95 % ВІ 5–26 міс.) в основній групі 1, а в основній групі 2 також 7 міс. (95 % ВІ 6–35 міс.), $p = 0,85$. Однорічна виживаність без прогресування у пацієток, які отримували ПХТ за схемою АТ, склала $(70,7 \pm 6,0 \%)$, а в пацієток, які отримували ПХТ за схемою ТР, – $(71,7 \pm 6,0 \%)$, $p = 0,88$.

При аналізі ефективності другої лінії ХТ у хворих на метастатичний ТНРГЗ встановлено, що серед 29 пацієток основної групи 1 (вінорельбін – 25 мг/м^2 , щотижнево) у 6 (20,7 %) хворих зареєстровано часткову відповідь, у 20 (69 %) – стабілізацію процесу, у 3 (10,3 %) пацієток – прогресування захворювання.

Серед 29 пацієток основної групи 2 (гемцитабін – 1000 мг/м^2 1, 8, 15 дні 28-денного циклу) у 6 (20,7 %) пацієток зареєстровано часткову відповідь, у 16 (55,2 %) – стабілізацію процесу, а у 7 (24,1 %) – прогресування захворювання.

Серед 29 пацієток основної групи 3 (капецитабін – 1000 мг/м^2 2 рази на добу 1–14 день 21-денного циклу) у 2 (6,9 %) пацієток зареєстровано часткову

відповідь, у 15 (51,7 %) – стабілізацію процесу, а у 12 (41,4 %) – прогресування захворювання.

Розподіл включених в дослідження хворих на метастатичний ТНРГЗ залежно від результатів об'єктивної оцінки відповіді на хіміотерапевтичне лікування представлено в таблиці 7.

Таблиця 7

Розподіл хворих на метастатичний ТНРГЗ за результатами лікування (за критеріями RECIST1.1)

Ефективність хіміотерапії	Група 1 (n=29)	Група 2 (n= 29)	Група 3 (n= 29)	p
Часткова відповідь	6 (20,7) ^{&}	6 (20,7) [#]	2 (6,9) [*]	0,02
Стабілізація	20 (69)	16 (55,2)	15 (51,7)	
Прогресування	3 (10,3)	7 (24,1)	12 (41,4)	

Примітки: для порівняння використано критерій Крускала–Уолліса, постеріорні порівняння проведені за критерієм Данна:

* – відмінність від груп 1, 2 статистично значима, $p < 0,05$;

– відмінність від групи 3 статистично значима, $p < 0,05$;

& – відмінність від групи 3 статистично значима, $p < 0,05$.

Проведеним аналізом виявлено статистично значиму різницю в ефективності схем другої лінії. Так, при порівнянні за критерієм Данна, часткова відповідь зустрічалась достовірно частіше у пацієток, які отримували ХТ за схемою вінорельбін або гемцитабін, порівняно з пацієтками, які отримували ХТ за протоколом капецитабін ($p = 0,02$).

Частота контролю над захворюванням склала 89,7 % серед пацієток основної групи 1 (вінорельбін), 75,9 % серед пацієток основної групи 2 (гемцитабін) та 58,6 % серед пацієток основної групи 3 (капецитабін). При проведенні порівняльного аналізу ефективності другої паліативної лінії монохіміотерапії виявлено, що у пацієток, які отримували ХТ за протоколами вінорельбін та гемцитабін, статистично достовірно частіше вдавалось досягти контролю над захворюванням порівняно з пацієтками, які отримували ХТ за протоколом капецитабін ($p = 0,02$).

Аналізом показників виживаності без прогресування не виявлено статистично значимих відмінностей між трьома групами ($p = 0,43$ за логранговим критерієм).

На рисунку 13 представлено криві виживаності без прогресування для пацієток з метастатичним ТНРГЗ залежно від схеми ХТ другої лінії (метод Каплана–Майєра). Медіана виживаності без прогресування у пацієток з метастатичним ТНРГЗ після другої паліативної лінії ХТ в основній групі 1 склала 6 міс. (95 % ВІ 4–8 міс.), в основній групі 2 також 6 міс. (95 % ВІ 3–7 міс.), а у основній групі 3 – 4 міс. (95 % ВІ 3–6 міс.).

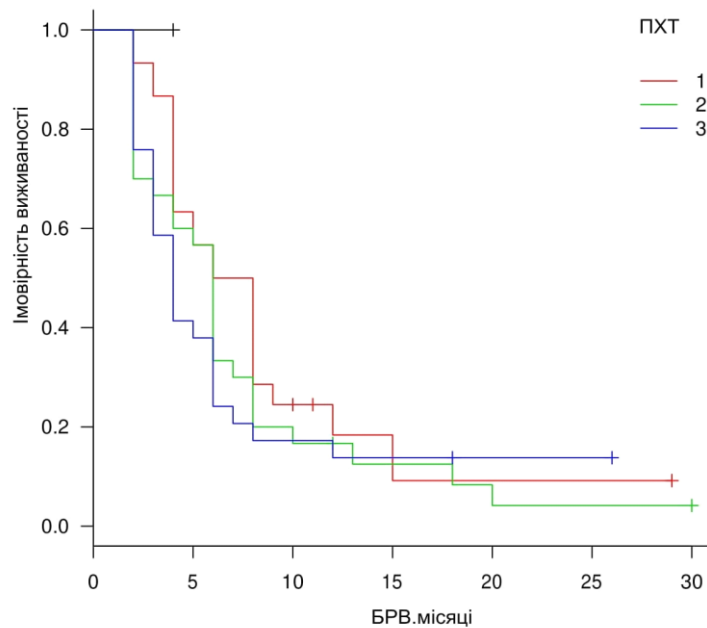


Рис. 13. Виживаність без прогресування у хворих на метастатичний ТНРГЗ. Група 1 – схема вінорельбін, група 2 – схема гемцитабін, група 3 – схема капецитабін; Log-RankTest, $p = 0,43$

Аналіз показників ЗВ не показав статистично значимих відмінностей між трьома групами ($p = 0,76$ за логранговим критерієм).

На рисунку 14 представлено криві загальної виживаності пацієнток з метастатичним ТНРГЗ залежно від схеми ХТ (метод Каплана–Майєра). Медіана ЗВ у пацієнток з метастатичним ТНРГЗ після другої паліативної лінії ХТ в основній групі 1 складала 11 міс. (95 % ВІ 7–14 міс.), в основній групі 2 – 10 міс. (95 % ВІ 6–14 міс.), в основній групі 3 також 10 міс. (95 % ВІ 5–11 міс.).

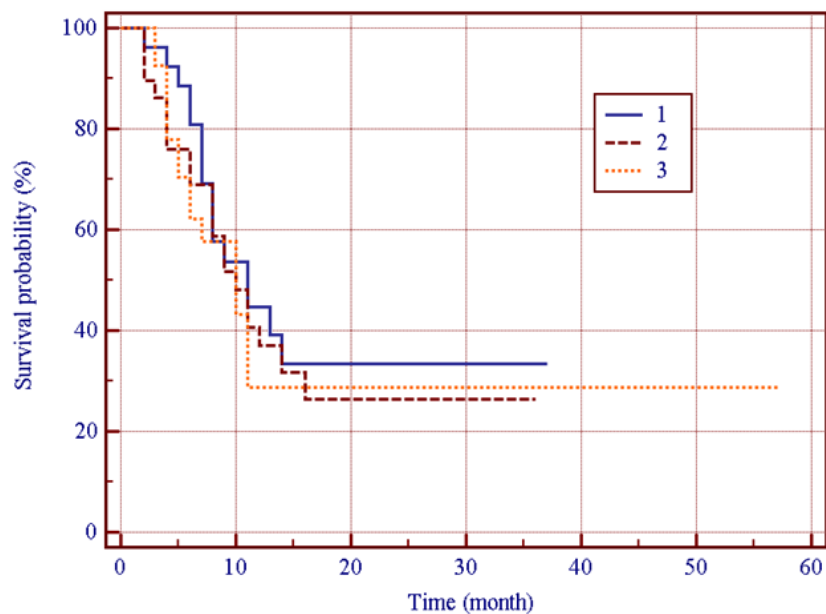


Рис. 14. Загальна виживаність у хворих на метастатичний ТНРГЗ. Група 1 – схема вінорельбін, група 2 – схема гемцитабін, група 3 – схема капецитабін; Log-Rank Test, $p = 0,76$

Фенотипові характеристики дендритних клітин у хворих на метастатичний тричі негативний рак грудної залози. У нашому дослідженні було встановлено, що на початкових етапах імунотерапії кількість генерованих ДК у хворих на ТНРГЗ була у 1,96 раза нижча щодо значень практично здорових людей (ПЗЛ) та становила $(1,89 \pm 0,18) \times 10^6/\text{мл}$ та $(3,87 \pm 0,32) \times 10^6/\text{мл}$ відповідно ($p < 0,05$). На заключних етапах імунотерапії кількість генерованих ДК дещо збільшувалась, однак ці зміни відбувались на рівні тенденції. Слід зазначити, що у всіх хворих нам вдалось отримати достатню кількість життєздатних ДК для проведення імунотерапії.

Проведена оцінка фенотипових характеристик ДК на початковому та заключному етапах імунотерапії. Було встановлено, що ДК, генеровані з моноцитів периферичної крові хворих на ТНРГЗ, до початку імунотерапії мають середній ступінь зрілості. Так, рівень експресії коstimуляторних молекул $\text{CD86}^+\text{HLA-DR}^+$ становив $(77,64 \pm 3,11) \%$, а рівень CD83^+ – $(28,60 \pm 2,79) \%$ (рис. 15), і вони цілком придатні для проведення імунотерапії.

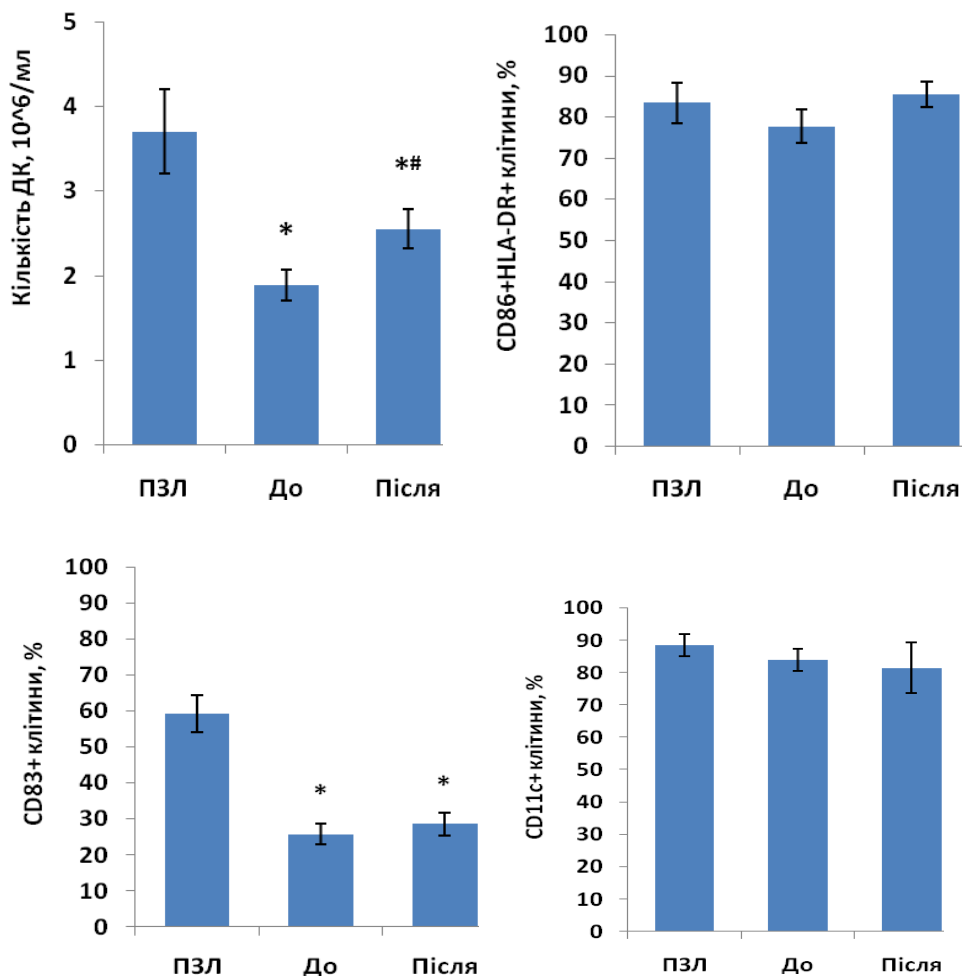


Рис. 15. Кількісні та фенотипові показники генерованих дендритних клітин, використаних для проведення імунотерапії хворих на ТНРГЗ:

- * – $p < 0,05$ порівняно з показниками практично здорових людей;
- # – $p < 0,05$ порівняно з показниками до імунотерапії.

Результати наших досліджень показали, що рівень ко-експресії молекул HLA-DR та CD86 на генерованих ДК хворих знаходився в межах показників ПЗЛ. На заключних етапах імунотерапії встановлено незначне збільшення рівня цих показників – на 9,2 % відносно початкових значень. Слід зазначити, що рівень експресії CD83+ був достовірно нижче значень ПЗЛ ($p < 0,05$) на етапах проведення імунотерапії, однак на заключному етапі спостерігалась тенденція до його збільшення.

Таким чином, застосування пухлинних антигенів, отриманих із пухлинної клітинної лінії MDA-MB-231 для навантаження дендритних клітин пацієнок, дає можливість отримати клітини достатнього ступеня зрілості, що підтверджено дослідженням фенотипових характеристик ДК. З кожним наступним етапом проведення вакцинотерапії зрілість ДК збільшується, тож для досягнення більш значного клінічного ефекту ДКВ доцільне проведення не менше 4–5 введень.

Аналіз ефективності та токсичності комбінації ДКВ з ХТ в другій лінії лікування хворих на метастатичний ТНРГЗ. Проведено дослідження безпеки ДКВ в комбінації зі стандартною ХТ (вінорельбін) у хворих на метастатичний ТНРГЗ, які раніше отримали одну лінію ХТ з приводу метастатичного захворювання.

Найчастішими ускладненнями лікування в обох групах хворих були гастроінтестинальна, гематологічна токсичність та нейротоксичність. Проте, статистично достовірних розбіжностей щодо основних видів токсичності не визначено, що може свідчити про їх зв'язок саме з ХТ.

Окремо проаналізована частота токсичних проявів III–IV ступеня, як таких, що можуть бути небезпечними для життя пацієнок (табл. 8).

Таблиця 8

Розподіл хворих на метастатичний ТНРГЗ за проявами токсичності лікування III–IV ступеня

Вид токсичності, ступінь (СТС NCI V.4.0)	Група хворих, n (%)		p
	основна	контрольна	
Нудота і блювання, III	4 (16,0)	4 (13,8)	> 0,05
Нудота і блювання, IV	0	1 (3,5)	
Нейтропенія, III	6 (24,0)	5 (17,2)	> 0,05
Нейтропенія, IV	2 (8,0)	1 (3,4)	> 0,05
Анемія, III	3 (12,0)	5 (17,2)	> 0,05
Тромбоцитопенія, III	2 (8,0)	2 (6,9)	> 0,05
Неврологічний біль, III	4 (16,0)	5 (17,2)	> 0,05
Втома, III	5 (20,0)	7 (24,1)	> 0,05
Артеріальна гіпертензія, III	2 (8,0)	2 (6,9)	> 0,05

Пацієнтки обох груп не мали статистично достовірних розбіжностей щодо побічних явищ III–IV ступеня.

Досліджено, що ін'єкції ДКВ не призводили до серйозних побічних ускладнень та алергічних реакцій в жодному випадку. У 7 (28 %) пацієток основної групи відзначали незначний (I–II ступеня) підйом температури тіла впродовж 2–3 днів після вакцинації. У хворих контрольної групи така побічна дія зареєстрована лише в одній пацієтці (3,4 %), $p < 0,05$.

Слід зазначити, що жодна пацієтка основної групи, яка отримала ДКВ, не вибула з дослідження внаслідок токсичності лікування.

Досліджена ефективність ДКВ в комбінації зі стандартною хіміотерапією у хворих на метастатичний ТНРГЗ: у 6 (24 %) пацієток основної групи (ДКВ + вінорельбін) зареєстровано часткову відповідь, у 15 (60 %) – стабілізацію процесу, а у 4 (16 %) – прогресування захворювання.

Серед 29 пацієток контрольної групи (вінорельбін) у 6 (20,7 %) зареєстровано часткову відповідь, у 20 (69 %) – стабілізацію процесу, у 3 (10,3 %) хворих – прогресування захворювання. Тобто, частота контролю над захворюванням (часткова відповідь + стабілізація) становила 84 % для основної групи та 89,7 % для контрольної, розбіжності статистично недостовірні ($p = 0,71$).

Медіана виживаності без прогресування у пацієток з метастатичним ТНРГЗ в основній групі (ДКВ + вінорельбін) склала 9,3 міс. (95 % ВІ 6 міс. – не досягнутий), у контрольній групі – 7 міс. (95 % ВІ 4–8 міс.)

На рисунку 16 представлено криві виживаності без прогресування у пацієток з метастатичним ТНРГЗ залежно від схеми лікування (метод Каплана–Майєра).

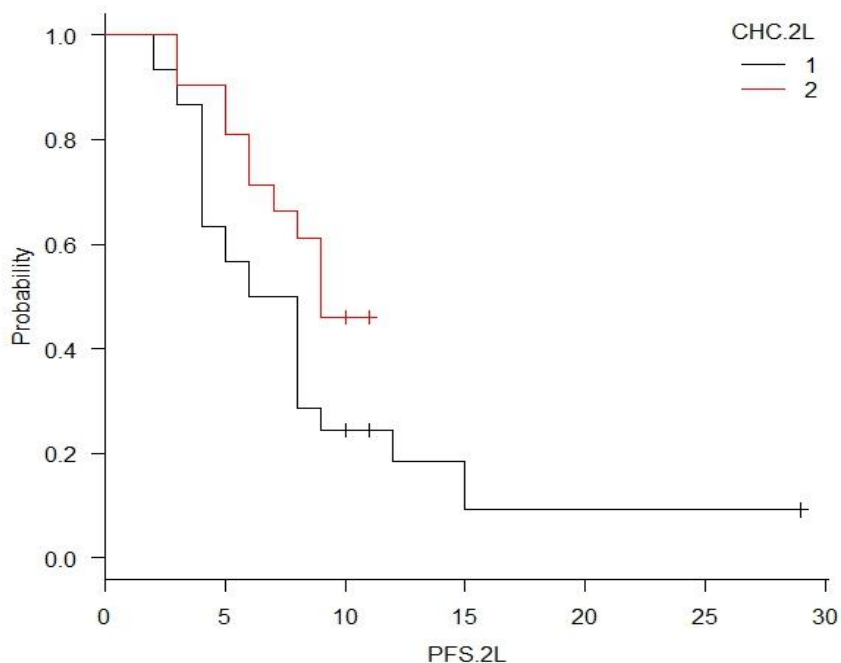


Рис. 16. Виживаність без прогресування у хворих на метастатичний ТНРГЗ. Група 1 – монотерапія вінорельбіном, група 2 – ДКВ + вінорельбін; Log-Rank Test, $p = 0,045$.

Аналіз показників виживаності без прогресування показав статистично достовірні відмінності між двома групами ($p = 0,045$ за логранговим критерієм).

За результатами даної роботи розроблено алгоритм лікування хворих на метастатичний ТНРГЗ (рис. 17).

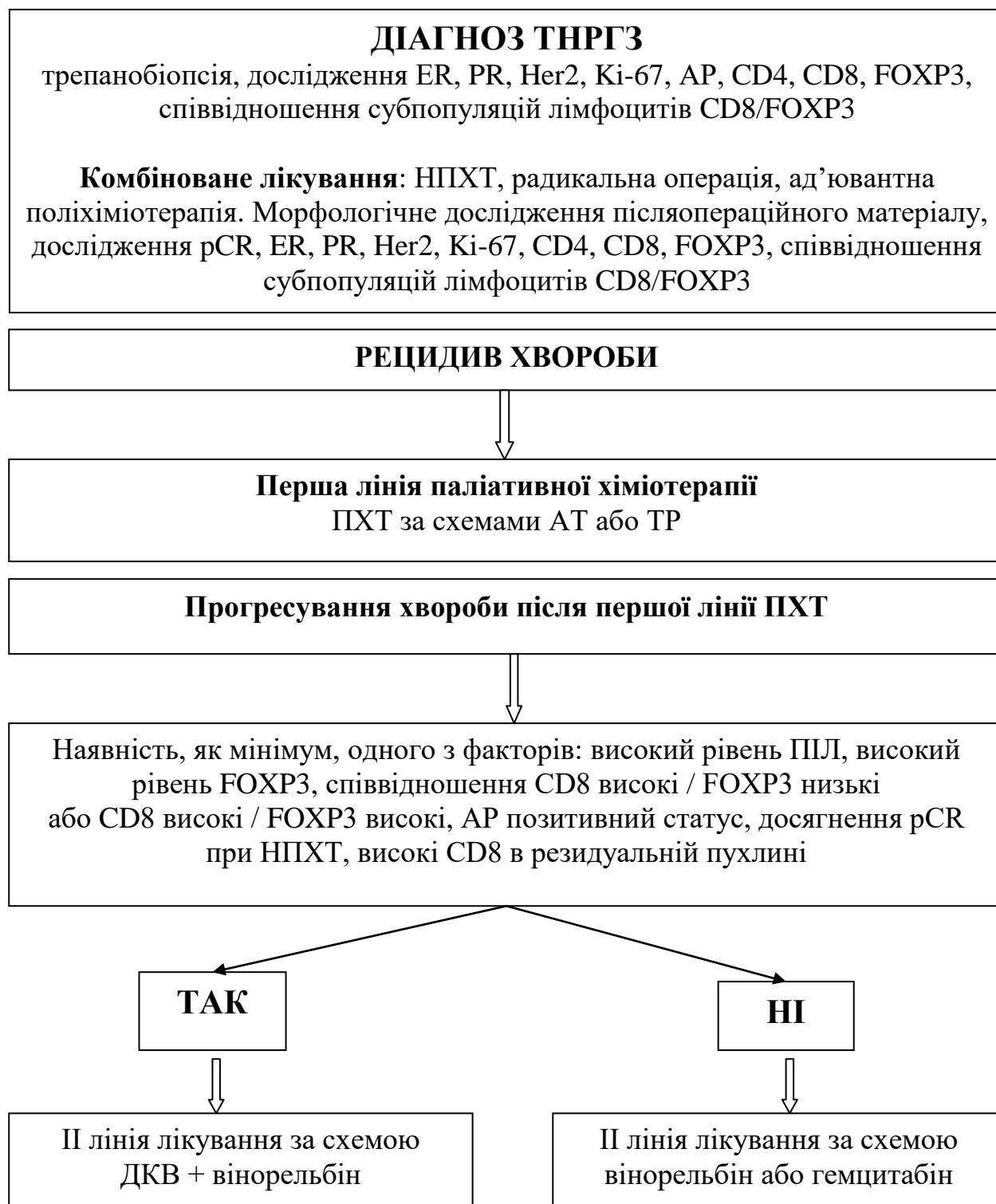


Рис. 17. Алгоритм лікування хворих на метастатичний ТНРГЗ

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі теоретично обґрунтовано та вирішено актуальну проблему сучасної онкології – підвищення ефективності лікування хворих на тричі негативний рак грудної залози шляхом оптимізації хіміотерапевтичного лікування з урахуванням біологічних характеристик пухлини та впровадження клітинної імунотерапії.

1. Визначено, що високий рівень пухлина інфільтруючих лімфоцитів та FOXP3+ лімфоцитів в імунному інфільтраті пухлини на момент встановлення діагнозу свідчить про зниження ризику смерті у хворих на тричі негативний рак грудної залози (BP 0,61; 95 % BI 0,45–0,82; $p = 0,001$ та BP 0,54; 95 % BI 0,37–0,80; $p = 0,002$ відповідно).

2. Доведено, що ризик смерті від тричі негативного раку грудної залози у пацієток із співвідношенням стромальних лімфоцитів CD8 низькі / FOXP3 низькі був вищим майже у два рази порівняно з хворими із співвідношенням стромальних лімфоцитів CD8 високі / FOXP3 високі, BP = 1,99 (BI 95 %, 1,17–3,41), ($\chi^2 = 9,6$ при 3 ступенях свободи; $p = 0,02$), а із співвідношенням інтратуморальних лімфоцитів CD8 низькі / FOXP3 низькі був вищим у 1,92 рази порівняно з хворими із співвідношенням інтратуморальних лімфоцитів CD8 високі / FOXP3 високі, BP = 1,92 (BI 95 %, 1,12–3,30), ($\chi^2 = 9,3$ при 3 ступенях свободи; $p = 0,02$).

3. З'ясовано підвищення стромальних CD8+ лімфоцитів у пухлині хворих, які отримали неад'ювантну поліхіміотерапію ($p = 0,01$), що свідчить про здатність хіміотерапії підвищувати імуногенність тричі негативного раку грудної залози, та є підставою для комбінації хіміотерапії з імунотерапією.

4. Виявлено незалежне прогностичне значення імунобіологічних маркерів пухлини у пацієток з тричі негативним раком грудної залози, у яких не було отримано повної морфологічної відповіді після неад'ювантної поліхіміотерапії. Встановлено, що збільшення кількості стромальних та інтратуморальних CD8+ лімфоцитів у резидуальній пухлині після неад'ювантної поліхіміотерапії зменшує ризик смерті від тричі негативного раку грудної залози: BP 0,6 (95 % BI 0,5–0,9; $p = 0,01$) та BP 0,6 (95 % BI 0,4–0,9; $p = 0,008$) на кожну градацію відповідно.

5. Встановлено, що ризик розвитку рецидиву хвороби був найвищим у пацієток з тричі негативним раком грудної залози – носіїв генотипу TT за геном TLR-4 (C399T) порівняно з пацієтками носіями генотипу CC – BP = 0,28 (BI 95 %, 0,10–0,80) та носіями генотипу CT – BP = 0,24 (BI 95 %, 0,08–0,74) відповідно ($p = 0,01$).

6. Доведено незалежне прогностичне значення експресії андрогенних рецепторів у пацієток з тричі негативним раком грудної залози. Медіана загальної виживаності становила 57 міс. проти 27 міс. у хворих, пухлинні клітини яких не мали експресії рецепторів андрогенів, $p < 0,0001$. Наявність експресії AR на пухлинних клітинах пацієток з ТНРГЗ знижує ризик смерті в середньому в 3 рази (BP 0,35; 95 % BI 0,20–0,57), $p = 0,0001$. Доведено вплив експресії AR на загальну виживаність хворих на метастатичний

тричі негативний рак грудної залози, які отримали другу паліативну лінію хіміотерапії. Визначено, що медіана загальної виживаності пацієнток з позитивними рецепторами андрогенів була довшою (12 міс. проти 9 міс.; $p = 0,04$).

7. Визначено, що у групі хворих, які отримали першу лінію лікування метастатичного тричі негативного раку грудної залози із використанням поліхіміотерапії за протоколом АТ, медіана тривалості відповіді на лікування становила 9,5 міс. (4,5–13,25 міс.), а у групі пацієнток, які отримали схему ТР – 8,5 міс. (4,7–12,25 міс.), медіани достовірно не відрізнялись ($p = 0,836$). У хворих, які лікувалися за протоколом АТ, медіана виживаності без прогресування склала 7 міс. (95 % ВІ 5–26 міс.), а у пацієнток, які отримували поліхіміотерапію за протоколом ТР, – також 7 міс. (95 % ВІ 6–35 міс.) Log-Rank Test; $p = 0,85$.

8. Визначено, що при метастатичному тричі негативному раку грудної залози в другій лінії паліативної хіміотерапії при оцінці безпосередніх результатів більш ефективними є вінорельбін та гемцитабін порівняно з капецитабіном (показник досягнення контролю над захворюванням склав 89,7 % проти 75,9 % та 58,6 % відповідно ($p = 0,02$)). При оцінці віддалених результатів встановлено, що статистично достовірної різниці у показниках виживаності без прогресування (Log-Rank Test, $p = 0,43$) та загальної виживаності (Log-Rank Test; $p = 0,76$) в усіх трьох групах хворих не виявлено.

9. Запропоновано алгоритм лікування хворих на метастатичний тричі негативний рак грудної залози та розроблено клінічний протокол застосування дендритноклітинної вакцини у хворих на метастатичний тричі негативний рак грудної залози в комбінації з хіміотерапією (вінорельбін) в другій лінії лікування. Встановлено високу клінічну ефективність запропонованої терапії – виживаність без прогресування вища у пацієнток з тричі негативним раком грудної залози, які отримали дендритноклітинну вакцину з вінорельбіном (медіана виживаності 9,3 міс. проти 7 міс. у контрольній групі; $p = 0,045$). Комбінація дендритноклітинної вакцини з хіміотерапією мала сприятливий профіль токсичності, без статистично достовірних розбіжностей порівняно з хіміотерапією ($p > 0,05$).

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. У хворих на тричі негативний рак грудної залози в матеріалі трепанобіопсії доцільно визначати імунобіологічні показники (ступінь інфільтрації пухлини ПЛ, CD4+, CD8+, FOXP3+, співвідношення субпопуляцій лімфоцитів CD8+ / FOXP3+) для визначення можливості проведення імунотерапії.

2. Визначення рівня стромальних CD4+ лімфоцитів та ПЛ необхідно для прогнозу ризику недосягнення повної морфологічної відповіді після хіміотерапії та оптимізації вибору режиму неад'ювантної поліхіміотерапії.

3. У першій лінії хіміотерапії метастатичного тричі негативного раку грудної залози доцільним є застосування режиму АТ (доксорубіцин-паклітаксел) або ТР (паклітаксел-карбоплатин).

4. Доцільне застосування дендритноклітинної вакцини у комбінації з вінорельбіном у другій лінії лікування метастатичного тричі негативного раку грудної залози у пацієток, які мають один із факторів: високий рівень ПЛЛ, високий рівень FOXP3+, співвідношення CD8+ високі / FOXP3+ низькі або CD8+високі / FOXP3+ високі, АР позитивний статус, досягнення рCR при неoad'ювантній поліхіміотерапії, високий рівень CD8+ лімфоцитів в резидуальній пухлині.

5. У другій лінії лікування метастатичного тричі негативного раку грудної залози у пацієток, які не мають вищезазначених факторів, доцільне проведення хіміотерапії вінорельбіном або гемцитабіном.

СПИСОК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Лялькин С.А. Оценка прогностического значения субпопуляций опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов у пациенток с метастатическим тройным негативным раком молочной железы / С.А. Лялькин // Репродуктивное здоровье. Восточная Европа. – 2019. – Т. 9, № 2. – С. 210–218.

2. Лялькин С.А. Рецепторы андрогена как прогностический фактор раннего рецидива заболевания у пациенток с трижды негативным раком молочной железы / С.А. Лялькин // Евразийский онкол. журн. – 2019. – Т. 7, № 4. – С. 405–411.

3. Лялькин С.А. Предиктивное значение опухоли инфильтрирующих лимфоцитов у пациенток с тройным негативным раком молочной железы, получивших неoad'ювантную химиотерапию / С.А. Лялькин // Репродуктивное здоровье. Восточная Европа. – 2018. – Т. 8, № 6. – С. 861–869.

4. Лялькин С.А. Метастатический трижды негативный рак молочной железы: современный взгляд на проблему / С.А. Лялькин // Репродуктивное здоровье. Восточная Европа. – 2016. – Т. 6, № 4. – С. 511–518.

5. Prognostic role of androgen receptor expression in patients with metastatic triple negative breast cancer / S.A. Lyalkin, N.O. Verevkina, O.O. Alexeyenko, L.A. Syvak // Experim. oncology. – 2020. – V. 42, № 2. – P. 140–143. *(Особистий внесок: обробка та узагальнення результатів власних досліджень, участь у лікуванні хворих, підготовка статті до друку.)*

6. Фенотипові характеристики дендритних клітин генерованих з моноцитів периферичної крові хворих на тричі негативний рак грудної залози / С.А. Лялькін, О.В. Скачкова, О.І. Горбач, Н.М. Храновська, Л.А. Сивак, Н.О. Верьовкіна // Вісник проблем біології і медицини. – 2020. – Вип. 2 (156). – С. 124–128. *(Особистий внесок: набір матеріалу, участь у лікуванні хворих, узагальнення результатів досліджень, обґрунтування висновків.)*

7. Лялькін С.А. Ефективність другої лінії паліативної хіміотерапії у хворих на метастатичний тричі негативний рак молочної залози: результати рандомізованого дослідження / С.А. Лялькін, Н.О. Верьовкіна, Л.А. Сивак // Укр. мед. часопис. – 2020. – Т. 2, № 2 (136). – С. 10–13. *(Особистий внесок: обробка та узагальнення результатів власних досліджень, участь у лікуванні хворих, обґрунтування висновків, підготовка статті до друку.)*

8. Лялькін С.А. Безпосередні та віддалені результати першої лінії поліхіміотерапії у хворих на метастатичний тричі негативний рак грудної залози. Остаточний аналіз рандомізованого дослідження / С.А. Лялькін, Л.А. Сивак, Н.О. Верьовкіна // Здоров'є жінки. – 2020. – № 3 (149). – С. 75–79. *(Особистий внесок: набір матеріалу, обробка та узагальнення результатів досліджень, участь у лікуванні хворих, обґрунтування висновків, підготовка статті до друку.)*

9. Лялькін С.А. Вплив рецепторів андрогену на ефективність хіміотерапевтичного лікування хворих на метастатичний тричі негативний рак грудної залози / С.А. Лялькін, Л.А. Сивак, Н.О. Верьовкіна // Здоров'є жінки. – 2020. – № 4 (150). – С. 80–84. *(Особистий внесок: набір матеріалу, обробка та узагальнення результатів досліджень, участь у лікуванні хворих, обґрунтування висновків, підготовка статті до друку.)*

10. Прогностична роль пухлина інфільтруючих лімфоцитів у пацієнок з метастатичним тричі негативним раком грудної залози / С.А. Лялькін, Н.О. Верьовкіна, Л.А. Сивак, Д.В. Варивончик // Збірник наукових праць співробітників НМАПО імені П.Л. Шупика. – 2019. – Вип. 33. – С. 74–81. *(Особистий внесок: обробка та узагальнення результатів власних досліджень, участь у лікуванні хворих, підготовка статті до друку.)*

11. Прогнозування раннього рецидиву захворювання у пацієнок з метастатичним тричі негативним раком грудної залози / С.А. Лялькін, Н.О. Верьовкіна, Л.А. Сивак, Д.В. Варивончик // Збірник наукових праць співробітників НМАПО імені П.Л. Шупика. – 2019. – Вип. 34. – С. 100–107. *(Особистий внесок: обробка та узагальнення результатів власних досліджень, участь у лікуванні хворих, підготовка статті до друку.)*

12. Особливості поліморфізму генів *TLR-2*, *TLR-4*, *TLR-9* та їхня роль у перебігу та прогнозі тричі негативного раку грудної залози / С.А. Лялькін, Л.А. Сивак, Н.М. Храновська, Н.О. Верьовкіна // Клін. онкологія. – 2019. – Т. 9, № 2 (34). – С. 106–109. *(Особистий внесок: набір матеріалу, участь у лікуванні хворих, узагальнення результатів досліджень, обґрунтування висновків.)*

13. Лялькін С.А. Прогнозування ефективності неоад'ювантної хіміотерапії за імунобіологічними показниками пухлинної тканини у пацієнок з тричі негативним раком грудної залози / С.А. Лялькін, Н.О. Верьовкіна, Л.А. Сивак // Лікарська справа. – 2019. – № 5–6. – С. 46–54. *(Особистий внесок: набір матеріалу, участь у лікуванні хворих, узагальнення результатів досліджень, підготовка статті до друку.)*

14. Взаємозв'язь поліморфізмів генів толл-подібних рецепторів 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. – Т. 5, № 2. – С. 206–213. *(Особистий внесок: участь у лікуванні хворих, узагальнення результатів досліджень, обґрунтування висновків.)*

15. Эффективность химиотерапии метастатического тройного негативного рака молочной железы: предварительные результаты рандомизированного исследования / С.А. Лялькин, Л.А. Сивак, И.И. Смоланка, Н.О. Веревкина // Репродуктивное здоровье. Восточная Европа. – 2017. – Т. 7, № 4. – С. 608–613. *(Особистий внесок: обробка та узагальнення результатів власних досліджень, участь у лікуванні хворих, підготовка статті до друку.)*

16. Вплив алельного поліморфізму гена CCR5 на перебіг місцево-поширеного раку грудної залози / Л.А. Сивак, Н.О. Верьовкіна, Н.Г. Горovenko, С.А. Лялькін, З.І. Россоха, О.Ф. Попова // Клин. онкология. – 2017. – № 1 (25). – С. 51–54. *(Особистий внесок: участь у лікуванні хворих, узагальнення результатів досліджень.)*

17. Імунна відповідь *in situ* після неoad'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: участь у лікуванні хворих, узагальнення результатів досліджень, обґрунтування висновків.)*

18. 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. Аскольский, М.Ю. Климанов // Лікарська справа. – 2017. – № 1–2. – С. 83–88. *(Особистий внесок: добір та аналіз наукової літератури.)*

19. Гастроінтестинальні ускладнення хіміотерапії у хворих на «тричі негативний» метастатичний рак грудної залози / Л.А. Сивак, Н.М. Майданевич, С.А. Лялькін, А.В. Аскольський, Н.В. Касап, М.Ю. Кліманов // Лікарська справа. – 2016. – № 5–6. – С. 73–77. *(Особистий внесок: участь у лікуванні хворих, аналіз наукової літератури, узагальнення результатів досліджень, обґрунтування висновків.)*

20. Прогнозування та профілактика гастроінтестинальної токсичності хіміотерапії у хворих на рак грудної залози / Л.А. Сивак, Н.М. Майданевич, С.А. Лялькін, А.В. Аскольський, О.М. Алексік, М.Ю. Кліманов, Н.В. Касап // Лікарська справа. – 2015. – № 1–2. – С. 108–112. *(Особистий внесок: набір матеріалу, участь у лікуванні хворих, узагальнення результатів досліджень.)*

21. 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: набір матеріалу, участь у лікуванні хворих, узагальнення результатів досліджень, обґрунтування висновків.)*

22. Ранняя антрациклиновая кардиотоксичность в консервативном лечении солидных опухолей / Л.А. Сивак, О.И. Солодяникова, Т.С. Головкин,

А.В. Аскольський, Л.А. Шевчук, С.А. Лялькин, Н.Н. Майданевич, Н.В. Касап, Н.О. Веревкина // Евразийский онкол. журн. – 2015. – № 4. – С. 86–93. *(Особистий внесок: участь у лікуванні хворих, узагальнення результатів досліджень.)*

23. Роль полиморфизма гена MTHFR (с. 677 С> Т) в развитии токсичности химиотерапии у больных раком молочной железы / Л.А. Сивак, Н.Н. Свергун, Н.Н. Храновская, С.А. Лялькин, А.А. Губарева, Н.Н. Майданевич, М.Ю. Климанов, А.В. Аскольський // Репродуктивное здоровье. Восточная Европа. – 2014. – № 2 (32). – С. 129–135. *(Особистий внесок: участь у лікуванні хворих, клінічний аналіз токсичності хіміотерапії, участь в обґрунтуванні висновків, підготовка статті до друку.)*

24. Ефективність застосування алгоритмів терапії супроводу з урахуванням факторів прогнозу токсичності хіміотерапії у хворих зі злоякісними пухлинами грудної залози / Л. А. Сивак, Г.О. Губарева, С.А. Лялькин, Н.М. Майданевич, М.Ю. Климанов, О.М. Алексик, А.В. Аскольський // Клин. онкология. – 2014. – № 1 (13). – С. 76–81. *(Особистий внесок: участь у лікуванні хворих, аналіз та узагальнення результатів досліджень.)*

25. Прогнозування перебігу раку грудної залози шляхом визначення гена інтерсектину ITS2N2 / Л.А. Сивак, І.А. Крячок, Г.О. Губарева, С.А. Лялькин, Н.М. Майданевич, А.В. Аскольський, С.В. Кропивко, О.В. Криклива, Г.В. Лаврик, О.В. Новохацька, Л.А. Циба, А.В. Риндич // Клин. онкология. – 2014. – № 3 (15). – С. 77–81. *(Особистий внесок: участь у лікуванні хворих, узагальнення результатів досліджень.)*

26. Сивак Л.А. Прогностичні фактори при раку грудної залози. Сучасний стан проблеми / Л.А. Сивак, Н.О. Верьовкіна, С. А. Лялькин // Клин. онкология. – 2014. – № 4 (16). – С. 46–49. *(Особистий внесок: добір та аналіз наукової літератури.)*

27. Роль молекулярно-генетичних показників у прогнозуванні токсичності хіміотерапії у хворих зі злоякісними пухлинами грудної залози / Л.А. Сивак, С.А. Лялькин, Н.М. Свергун, Г.О. Губарева, М.Ю. Климанов, А.В. Аскольський, Н.В. Касап // Клин. онкология. – 2013. – № 2 (10). – С. 126–129. *(Особистий внесок: обробка та узагальнення результатів власних досліджень, участь у лікуванні хворих, підготовка статті до друку.)*

28. Трижды негативный рак грудной железы: современный взгляд на проблему / Л.А. Сивак, С.А. Лялькин, Н.Н. Майданевич, М.Ю. Климанов, А.В. Аскольський, Н.В. Касап // Клин. онкология. – 2013. – № 3 (11). – С. 60–62. *(Особистий внесок здобувача: добір та аналіз наукової літератури.)*

29. Токсичний вплив хіміотерапії на травний канал / Л.А. Сивак, Н.М. Майданевич, Г.О. Губарева, С.А. Лялькин, О.М. Алексик, А.В. Аскольський // Лікарська справа. – 2012. – № 3–4. – С. 25–30. *(Особистий внесок: проведено добір та аналіз наукової літератури, написання статті.)*

30. Фактори прогнозу гастроінтестинальної токсичності хіміотерапії у хворих на рак грудної залози / Л.А. Сивак, Н.М. Майданевич, Г.О. Губарева, С.А. Лялькин, А.В. Аскольський, М.Ю. Климанов, Н.В. Касап // Клин.

онкологія. – 2012. – № 7 (3). – С. 79–81. (*Особистий внесок: участь у лікуванні хворих, аналіз результатів клініко-лабораторного обстеження хворих, узагальнення результатів досліджень.*)

31. Роль гена інтерсектину-2 у прогнозуванні перебігу раку грудної залози / І.А. Крячок, Л.А. Сивак, Г.О. Губарева, С.А. Лялькін, Н.М. Майданевич, М.Ю. Кліманов, А.В. Аскольський, Н.В. Касап, І.І. Смоланка, О.М. Грабовий, Л.А. Циба, О.В. Новохацька, С.В. Кропивка, А.В. Риндич // Клін. онкологія. – 2012. – № 8 (4). – С. 158–160. (*Особистий внесок: участь у лікуванні хворих, узагальнення результатів досліджень.*)

32. Сучасні принципи хіміотерапевтичного лікування метастатичного раку молочної залози / Л.А. Сивак, Н.М. Майданевич, С.А. Лялькін, А.В. Аскольський, С.Ю. Алпатьєва, М.А. Багірян, М.Ю. Кліманов, Н.В. Касап // Лікарська справа. – 2011. – № 1–2. – С. 70–75. (*Особистий внесок: добір та аналіз наукової літератури, підготовка статті до друку.*)

33. Пат. № 115522, UA, МПК G01N 33/49 (2006.01). Спосіб прогнозування ефективності платиновмісної терапії у хворих на метастатичний тричі негативний рак грудної залози / Сивак Л.А., Касап Н.В., Лялькін С.А., Верьовкіна Н.О., Тарасенко Т.Є., Сторчай Д.М., Тодор І.М., Лук'янова Н.Ю., Чехун В.Ф. ; Національний інститут раку, Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України (UA). – № u201608320 ; заявл. 28.07.2016 ; опубл. 25.04.2017. – Бюл. 8. (*Особистий внесок: аналіз літератури, розробка методики, оформлення патента.*)

34. Пат. 88089 Україна МПК А61В 10/00 G01N 33/53. Спосіб лікування гастроінтестинальної токсичності хіміотерапії у хворих на рак грудної залози / Сивак Л.А., Майданевич Н.М., Губарева Г.О., Храновська Н.М., Лялькін С.А., Аскольський А.В., Свергун Н.М. ; Національний інститут раку. – № u 201312679 ; заявл. 30.10.2013 ; опубл. 25.02.2014. – Бюл. 12. (*Особистий внесок: аналіз літератури, розробка методики, оформлення патента.*)

35. Алексеєнко О.О. Прогностичне значення експресії рецепторів андрогенів у хворих на тричі негативний рак грудної залози / О.О. Алексеєнко, С.А. Лялькін, Л.А. Сивак // World Cancer Day 2020 : наук.-практ. конф. молодих вчених, присвяч. 100-річчю Національного інституту раку та Всесвітньому дню боротьби з раком, 4 лютого 2020 р., Київ. – Клін. онкологія. – 2019. – Т. 9, № 4 (36). – С. 249.

36. Імунологічні показники у хворих на метастатичний рак грудної залози прогностично несприятливих молекулярних підтипів / Ф.В. Фільчаков, С.М. Кукушкіна, Л.А. Сивак, С.А. Лялькін, Н.О. Верьовкіна, Т.Є. Тарасенко // Впровадження сучасних досягнень медичної науки в практику охорони здоров'я України : матеріали VII Міжнар. мед. конгресу, 25–27 квітня 2018 р., м. Київ. – Київ, 2018. – С. 65–66.

37. CD8+, CD4+ and FOXP3+ cell profiles and their change after neoadjuvant chemotherapy in patients with triple negative breast cancer / N.O. Verovkina, S. Lyalkin, L.A. Syvak, A. Askolskyi, N. Majdanevych // ESMO

2018 Congress : abstr. book, Munich, Germany, 19–23 October 2018. – Ann. Oncology. – 2018. – V. 29, suppl. 8. – P. viii87–viii89.

38. Коротка ізoформа інтерсектину 2 (ITSN2-S) як потенційний маркер злоякісності пухлин грудної залози / С.В. Кропивко, Л.О. Циба., Л.А. Сивак, С.А. Лялькін, Т.Є. Тарасенко, Г.О. Губарева, О.М. Грабовой, А.В. Риндич // Онкологічна допомога: можливості і переваги мультидисциплінарного підходу : матеріали наук.-практ. семінару, м. Херсон, 21–22 вересня 2017 р. – Херсон, 2017. – С. 62–68.

39. The correlation between toll-like receptor genes polymorphisms, tumor microenvironment characteristics and the effectiveness of preoperative chemotherapy for locally advanced breast cancer / N.O. Verovkina, L.A. Sivak, S.A. Lyalkin, Z.I. Rossocha, E.P. Fedorova // ESMO 2017 Congress : abstr. book, Madrid, Spain, 08–12 September 2017. – Ann. Oncology. – 2017. – V. 28, suppl. 5. – P. 70.

40. Взаимосвязь аллельного полиморфизма гена CCR5 на течение местно-распространенного рака молочной железы и эффективность неоадьювантной химиотерапии / Н.О. Веревкина, Л.А. Сивак, И.Г. Горовенко, С.А. Лялькин, З.И. Россоха, О.Ф. Попова // Белые ночи 2017 : сб. науч. работ III Петербург. междунар. онкол. форума, 22–24 июня 2017 г. – Санкт-Петербург, 2017. – С. 63.

41. Тромбоцитопенія у хворих на метастатичний тричі негативний рак грудної залози / Л.А. Сивак, Н.М. Майданевич, С.А. Лялькін, А.В. Аскольський, М.Ю. Кліманов, Н.В. Касап, Н.О. Верьовкіна // Впровадження сучасних досягнень медичної науки в практику охорони здоров'я України : V Міжнар. мед. конгрес, 19–21 квітня 2016 р., м. Київ. – Київ, 2016. – С. 177.

42. Значение биологических маркеров при трижды негативном раке молочной железы / Н.О. Веревкина, Л.А. Сивак, С.А. Лялькин, А.В. Аскольский, Н.В. Касап, Н.Н. Майданевич // IX съезд онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии : тез., 15–17 июня 2016 г., Минск. – Евразийский онкол. журн. – 2016. – № 4. – С. 307–308.

43. 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.

44. Попередні результати ефективності хіміотерапії у хворих на метастатичний тричі негативний рак грудної залози / Л.А. Сивак, С.А. Лялькін, Н.М. Майданевич, А.В. Аскольський, М.Ю. Кліманов, Н.В. Касап, Н.О. Верьовкіна, Т.Є. Тарасенко // Сучасні можливості, проблеми і перспективи

онкологічної допомоги : матеріали наук.-практ. семінару, м. Херсон, 25–26 серпня 2016 р. – Херсон, 2016. – С. 82–88.

45. Prognostic and predictive value of CD8 + , CD4 + infiltration and KI-67 level in the post-chemotherapy residual disease in triple negative breast cancer / N.O. Verovkina, L.A. Syvak, S.A. Lyalkin, N. Majdanevych, A. Askolskyi, M.U. Klimanov, N.V. Kasap, M.S. Krotevich // ESMO 2015 Congress : abstr. book, Vienna, Austria, 26–28 September 2015. – Ann. Oncol. – 2015. – V. 26, suppl. 8. – P. viii5–viii14.

46. Сучасні погляди на профілактику гастроінтестинальної токсичності у хворих на метастатичний «тричі негативний» рак грудної залози / Л.А. Сивак, Н.М. Майданевич, С.А. Лялькін, А.В. Аскольський, М.Ю. Кліманов, Н.В. Касап, Н.О. Верьовкіна // Сучасна онкологія: діагностика та лікування : тези наук.-практ. конф. з міжнар. участю (для молодих вчених), 17 квітня 2015 р., Київ. – Клин. онкологія. – 2015. – № 2 (18). – С. 78.

47. Прогностичне значення біологічних маркерів 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. Кротевиц // Персоніфікація лікування гормонозалежних пухлин : тези наук.-практ. конф., 15–16 жовтня 2015 р., Яремче. – Онкологія. – 2015. – Т. 17, № 3 (65). – С. 195.

48. Роль електрокардіографії та УЗД серця у прогнозуванні кардіотоксичних ускладнень антрациклінової хіміотерапії / Л.А. Сивак, Г.О. Губарева, С.А. Лялькін, А.В. Аскольський, М.Ю. Кліманов, Н.М. Майданевич // Людина та ліки – Україна : V Націон. конгрес, Київ, 20–22 березня 2012 р. – С. 31–32.

АНОТАЦІЯ

Лялькін С.А. Оптимізація хіміотерапевтичного лікування хворих на метастатичний тричі негативний рак грудної залози. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю 14.01.07 «Онкологія». Національний інститут раку, Київ, 2020.

Дисертацію присвячено вирішенню актуальної проблеми сучасної онкології – покращанню результатів лікування хворих на ТНРГЗ шляхом оптимізації хіміотерапевтичного лікування з урахуванням біологічних характеристик пухлини, впровадження клітинної імунотерапії.

Досліджено вплив імунобіологічних показників (ступінь інфільтрації пухлини ПЛ, CD4+, CD8+, FOXP3+) на перебіг ТНРГЗ. Науково обґрунтовано, що високий рівень ПЛ та FOXP3+ лімфоцитів в імунному інфільтраті свідчить про зниження ризику смерті у хворих на ТНРГЗ (ВР 0,61; 95 % ВІ 0,45–0,82; $p = 0,001$ та ВР 0,54; 95 % ВІ 0,37–0,80; $p = 0,002$ відповідно). Визначено, що

у пацієнток з ТНРГЗ, які отримували НПХТ, виявлено статистично достовірне підвищення стромальних CD8+ лімфоцитів після завершення НПХТ ($p = 0,01$). Розроблено логістичну модель прогнозування ризику недосягнення pCR після НПХТ серед хворих на ТНРГЗ, яка враховує рівень стромальних CD4+ лімфоцитів та рівень ПЛЛ.

Встановлено, що збільшення кількості стромальних та інтрагуморальних CD8+ лімфоцитів у резидуальній пухлині після НПХТ зменшує ризик смерті від ТНРГЗ: ВР 0,6 (95 % ВІ 0,5–0,9; $p = 0,01$) та ВР 0,6 (95 % ВІ 0,4–0,9; $p = 0,008$). Доведено незалежне прогностичне значення експресії AP у пацієнток з ТНРГЗ. Медіана ЗВ становила 57 міс. проти 27 міс. у хворих, пухлинні клітини яких не мали експресії AP; $p < 0,0001$. Оцінено та порівняно безпосередню та віддалену ефективність першої лінії ПХТ за стандартними схемами (ТР і АТ) у хворих на метастатичний ТНРГЗ. Статистично достовірної різниці медіан тривалості відповіді на лікування та виживаності без прогресування в обох групах не встановлено.

Визначено, що при метастатичному ТНРГЗ в другій лінії ХТ при оцінці безпосередніх результатів більш ефективними є вінорельбін та гемцитабін порівняно з капецитабіном (частота контролю над захворюванням склала 89,7 % проти 75,9 % та 58,6 % відповідно ($p = 0,02$); статистично достовірної різниці у показниках виживаності без прогресування (Log-Rank Test; $p = 0,43$) та ЗВ (Log-Rank Test; $p = 0,76$) в усіх трьох групах хворих не виявлено. Розроблено та впроваджено клінічний протокол використання ДКВ у хворих на метастатичний ТНРГЗ в комбінації з ХТ (вінорельбін) в другій лінії. Встановлено, що виживаність без прогресування вища у пацієнток з ТНРГЗ, які отримали ДКВ з вінорельбіном (медіана виживаності без прогресування 9,3 міс. проти 7 міс. у контрольній групі; $p = 0,045$).

Ключові слова: тричі негативний рак грудної залози, хіміотерапія, пухлина інфільтруючі лімфоцити, CD4+, FOXP3+ та CD8+ лімфоцити, андрогенні рецептори, клінічний прогноз, дендритноклітинна вакцина.

АННОТАЦІЯ

Лялькин С.А. Оптимизация химиотерапевтического лечения больных с метастатическим трижды негативным раком молочной железы. – Квалификационная научная работа на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 14.01.07 «Онкология». Национальный институт рака, Киев, 2020.

Диссертация посвящена решению актуальной проблемы современной онкологии – улучшению результатов лечения больных с трижды негативным раком молочной железы (ТНРМЖ) путем оптимизации химиотерапевтического лечения с учетом биологических характеристик опухоли, внедрения клеточной иммунотерапии.

Исследовано влияние иммунобиологических показателей (степень инфильтрации опухоли инфильтрирующими лимфоцитами (ОИЛ), CD4+, CD8+, FOXP3+ лимфоцитами) на течение ТНРМЖ.

Научно обосновано, что высокий уровень ОИЛ и FOXP3+ лимфоцитов в иммунном инфильтрате свидетельствует о снижении риска смерти у больных с ТНРМЖ (HR 0,61; 95 % ДИ 0,45–0,82; $p = 0,001$ и HR 0,54; 95 % ДИ 0,37–0,80; $p = 0,002$ соответственно). Определено, что у пациенток с ТНРМЖ, получавших неoadъювантную полихимиотерапию (НПХТ), выявлено статистически достоверное повышение стромальных CD8+ лимфоцитов после завершения НПХТ ($p = 0,01$).

Разработана логистическая модель прогнозирования риска недостижения pCR после НПХТ у больных с ТНРМЖ, которая учитывает уровень стромальных CD4+ лимфоцитов и уровень ОИЛ. Установлено, что увеличение количества стромальных и интратуморальных CD8+ лимфоцитов в резидуальной опухоли после НПХТ уменьшает риск смерти от ТНРМЖ: HR 0,6 (95 % ДИ 0,5–0,9; $p = 0,01$) и HR 0,6 (95 % ДИ 0,4–0,9; $p = 0,008$) на каждую градацию соответственно.

Доказано независимое прогностическое значение экспрессии андрогенных рецепторов (АР) у пациенток с ТНРМЖ. Медиана общей выживаемости (ОВ) составила 57 мес. против 27 мес. у больных, опухолевые клетки которых не имели экспрессии АР, $p < 0,0001$. Проведено оценку и сравнение непосредственной и отдаленной эффективности первой линии лечения по стандартным схемам химиотерапии (ТР и АТ) у больных с метастатическим ТНРМЖ. Статистически достоверной разницы медиан продолжительности ответа на химиотерапию и выживаемости без прогрессирования в обеих группах не установлено.

Определено, что при метастатическом ТНРМЖ во второй линии химиотерапии при оценке непосредственных результатов более эффективными являются винорельбин и гемцитабин по сравнению с капецитабином (показатель контроля над заболеванием составил 89,7 % против 75,9 % и 58,6 % соответственно ($p = 0,02$); достоверных различий показателей выживаемости без прогрессирования (Log-Rank Test; $p = 0,43$) и ОВ (Log-Rank Test; $p = 0,76$) во всех трех группах больных не выявлено.

Разработан и внедрен клинический протокол использования ДКВ у больных с метастатическим ТНРМЖ в комбинации с химиотерапией (винорельбин) во второй линии. Установлено, что выживаемость без прогрессирования выше у пациенток с ТНРМЖ, получивших ДКВ с винорельбином (медиана выживаемости без прогрессирования 9,3 мес. против 7 мес. в контрольной группе; $p = 0,045$).

Ключевые слова: трижды негативный рак молочной железы, химиотерапия, опухоль инфильтрирующие лимфоциты, CD4+, FOXP3+ и CD8+ лимфоциты, рецепторы андрогена, клинический прогноз, дендритноклеточная вакцина.

SUMMARY

Lyalkin S.A. Optimization of chemotherapy in patients with metastatic triple negative breast cancer. – Qualifying research paper as manuscript.

Thesis for the degree of Doctor of Medical Sciences, specialty 14.01.07 «Oncology». National Cancer Institute, Kyiv, 2020.

The dissertation is focused on the solving of one of the most difficult problem in oncology – the improvement of the treatment of patients with metastatic triple negative breast cancer (TNBC) by chemotherapy optimization based on tumor biology, implementing the method of cell-based immunotherapy.

The prognostic role of immunobiologic factors (tumor infiltrating lymphocytes (TIL) and their subpopulations, stromal and intratumoral CD4+, CD8+ and stromal FOXP3+ lymphocytes) was assessed in patients with TNBC. It was proved, that high level of FOXP3+ lymphocytes is associated with the lower risk of TNBC relapse (HR 0,66; 95 % CI 0,50–0,88; $p = 0,005$). The high level of TIL and FOXP3+ lymphocytes in biopsy specimens was correlated with lower risk of death from TNBC (HR 0,61; 95 % CI 0,45–0,82; $p = 0,001$ and HR 0,54; 95 % CI 0,37–0,80; $p = 0,002$, respectively). It was observed, that the risk of death in TNBC patients with ratio of stromal CD8^{low} / FOXP3^{low} was almost twice as high as in patients with ratio CD8^{high} / FOXP3^{high}, HR = 1,99 (CI 95 %, 1,17–3,41), $p = 0,02$; and in patients with ratio of intratumoral CD8^{low} / FOXP3^{low} the risk of death was in 1,92 times higher than in patients with ratio CD8^{high} / FOXP3^{high}, HR = 1,92 (CI 95 %, 1,12–3,30), $p = 0,02$. The median OS in TNBC patients was 48 months (95 % CI 36–85 months) in subgroup of stromal CD8^{high}/FOXP3^{high}, in subgroup CD8^{low} / FOXP3^{high} – 22 months (95 % CI 13–51 months), in subgroup CD8^{high}/ FOXP3^{low} the median OS was 52 months (95 % CI 24–100 months), and in subgroup CD8^{low} / FOXP3^{low} – 24 months (95 % CI 17–29 months). The impact of chemotherapy on tumor immune microenvironment (stromal and parenchymal biomarkers) was evaluated. It was observed, that TNBC patients had statistically significant increase of stromal CD8+ lymphocytes after neoadjuvant chemotherapy ($p = 0,01$). These results suggest that chemotherapy can increase the immunogenicity of TNBC and provide the basis for the combination of chemotherapy and immunotherapy. The mathematical model of pCR prognosis after neoadjuvant chemotherapy in patients with TNBC was proposed based on stromal CD4+ and TIL level. We observed that the increase of stromal and intratumoral CD8+ lymphocytes in residual tumor after chemotherapy decreases the risk of death from TNBC, HR 0,6 (95 % CI 0,5–0,9; $p = 0,01$) and HR 0,6 (95 % CI 0,4–0,9; $p = 0,008$), respectively. The significant independent prognostic role of androgen receptors (AR) was found in TNBC patients. Median overall survival was 57 months in AR positive patients versus 27 months in AR negative, $p < 0,0001$. The significant impact of AR expression on overall survival of patients with metastatic TNBC received the second line chemotherapy also was observed. The median overall survival in AR positive patients was higher (12 months versus 9 months, $p = 0,04$). Efficacy and safety of the first and the second line chemotherapy was evaluated in patients with metastatic TNBC in randomized studies. No statistically significant difference was observed in median duration of response and progression free survival in patients received the first line chemotherapy using

regimens AT (doxorubicine, paclitaxel) and TP (paclitaxel, carboplatin). Vinorelbine and gemcitabine regimens were significantly more effective as the second line chemotherapy compared to capecitabine (disease control was 89,7 % and 75,9 % versus 58,6 % respectively), $p = 0,02$; no statistically significant difference was observed in progression free ($p = 0,43$) and overall survival ($p = 0,76$). Biomarkers of potential immunotherapy efficacy were defined: high level of TIL and FOXP3+, ratio $CD8^{high}/FOXP3^{low}$ or ratio $CD8^{high} / FOXP3^{high}$, AR positive status, pCR after neoadjuvant chemotherapy, high level of CD8+ in residual tumor. The new clinical protocol has been developed and implemented using the dendritic cell vaccine (DCV) in combination with chemotherapy (vinorelbine) in the second line therapy in patients with metastatic TNBC. In our study the phenotypic analysis of the autologous generated DC and populations of peripheral blood lymphocytes was performed. Our study showed that the maturity of DCs was increased after each subsequent stage of immunotherapy, so to achieve the most significant clinical effect DCV should be administered at least 4–5 times. The incidence and grade of toxicity of DCV and chemotherapy combination were similar to that of chemotherapy alone. The progression free survival in combination group was significantly higher than in control group (9,3 months versus 7 months, $p = 0,045$). Based on these results, the algorithm of treatment of metastatic TNBC patients was developed.

Key words: triple negative breast cancer, chemotherapy, tumor-infiltrating lymphocytes, CD4+, FOXP3+ and CD8+ lymphocytes, androgen receptors, clinical prognosis, dendritic cell vaccine.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

AUC	–	площа під ROC-кривою; площа під фармакінетичною кривою (розрахунок дози карбоплатину)
ER	–	estrogen receptor, рецептор естрогену
HER2/neu	–	ген HER2/neu
HR	–	hazard ratio
pCR	–	повна морфологічна відповідь
PR	–	progesteron receptor, рецептор прогестерону
ROC	–	receiver operating characteristic
TLR	–	toll-like receptor, тол-подібні рецептори
AR	–	андрогенні рецептори
AT	–	схема поліхіміотерапії (доксорубіцин, паклітаксел)
БРВ	–	безрецидивна виживаність
ВІ	–	інтервал вірогідності
ВР	–	відношення ризиків
ВШ	–	відношення шансів
ДК	–	дендритні клітини
ДКВ	–	дендритноклітинна вакцина

ЗВ	–	загальна виживаність
ІГХ	–	імуногістохімія
КТ	–	комп'ютерна томографія
МкАт	–	моноклональне антитіло
НПХТ	–	неoad'ювантна поліхіміотерапія
ОГП	–	органи грудної порожнини
ОЧП	–	органи черевної порожнини
ПЗЛ	–	практично здорові люди
ПЛ	–	пухлина інфільтруючі лімфоцити
ПЛР	–	полімеразна ланцюгова реакція
ПХТ	–	поліхіміотерапія
РГЗ	–	рак грудної залози
ТНРГЗ	–	тричі негативний рак грудної залози
ТР	–	схема поліхіміотерапії (паклітаксел, карбоплатин)
ХТ	–	хіміотерапія