

Національна академія наук України
Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології
ім. Р.Є.Кавецького
Міністерство охорони здоров'я України
КНП «Обласне територіальне медичне об'єднання м.Краматорська»
Національна академія наук України
Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології
ім. Р.Є.Кавецького

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

ГЛЯНЬКО МИХАЙЛО ВАСИЛЬОВИЧ

УДК: 616-006.6:615.28+577.2

ДИСЕРТАЦІЯ

**ІНДИВІДУАЛІЗАЦІЯ КОМБІНОВАНОГО
ЛІКУВАННЯ ХВОРИХ НА РАК ПРЯМОЇ КИШКИ: МОЛЕКУЛЯРНО-
БІОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ**
14.01.07 – онкологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук
Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ Глянько М.В.

Науковий керівник Думанський Юрій Васильович, член-кореспондент НАМН
України, доктор медичних наук, професор

Київ – 2021

АНОТАЦІЯ *Глянько М.В.* Індивідуалізація комбінованого лікування хворих на рак прямої кишки: молекулярно-біологічні аспекти.- Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук зі спеціальності 14.01.07 – онкологія. - Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Київ, 2021.

Хоча сьогодні спостерігається стрімке збільшення числа хіміопрепаратів та їх включення в схеми лікування хворих на рак прямої кишки (РПК), але медіана виживання хворих складає близько 18 - 24 міс. При цьому вибір медикаментозного лікування хворих на РПК ґрунтується, як правило, на клінічних рекомендаціях, розроблених доказовою медициною, основним недоліком якого є неврахування індивідуальних особливостей, як організму, так і пухлини, що супроводжується зниженням ефективності терапії. Особливістю ж солідної пухлини є її біологічна неоднорідність або гетерогенність: перебіг пухлинного процесу може розвиватись по різному навіть в межах однорідної групи пацієнтів, при цьому молекулярний профіль, що є унікальною характеристикою пухлини конкретного хворого, може змінюватися протягом розвитку захворювання. Такі зміни обумовлюють появу нових фенотипових особливостей пухлини, а інформація про молекулярно-генетичну характеристику пухлини стає необхідним компонентом при виборі оптимальної терапії нарівні з основними методами обстеження. Тому не викликає сумніву необхідність переходу до персоналізованої медицини таких хворих із оцінкою молекулярно-генетичних прогностичних та предиктивних маркерів, що дозволить вірно використовувати арсенал цитостатичної терапії та раціонально підходити до лікування кожної окремої людини.

Існує велике число маркерів перебігу пухлинного процесу при РПК: антигени проліферації, маркери пухлинної супресії, синтезу і пошкодження ДНК, фактори росту і їх рецептори, білки, що асоційовані з інвазією, міграцією та метастазуванням злоякісно трансформованих клітин, але лишаються питання

про найбільш інформативні прогностичні молекулярно-біологічні маркери та їх кореляції із ефективністю лікування хворих на РПК.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню можливості підвищення ефективності лікування хворих на РПК шляхом застосування індивідуалізованих схем поліхіміотерапії (ПХТ) при врахуванні особливості експресії певних біологічних маркерів, асоційованих із медикаментозною резистентністю та злоякісністю пухлин.

Для передбачення ефективності однієї зі стандартних ад'ювантних схем ПХТ FOLFOX-6 чи FOLFIRI шляхом визначення статусу експресії ряду маркерів ПК, було сформовано три групи хворих на РПК:

1) ретроспективна група - 50 хворих, у яких було проведено дослідження рівня експресії маркерів, що опосередковують адгезивні властивості клітин, та маркерів медикаментозної резистентності в ПК і застосована ад'ювантна стандартна схема ПХТ FOLFOX-6;

2) проспективна група хворих - 53 хворих, у яких також були проведені дослідження експресії маркера адгезії Е-кадгерину та маркерів медикаментозної резистентності Торо Іа і ERCC1 в ПК. В залежності від профілю експресії Е-кадгерину, Торо Іа і ERCC1 у хворих даної групи застосовувались індивідуалізовані схеми ПХТ FOLFOX-6 (30 хворих) або FOLFIRI (23 хворих);

3) контрольна група хворих - 32 хворих, у яких не проводилось дослідження експресії маркерів ПК, а післяопераційна ПХТ проведена за стандартною схемою FOLFOX-6.

Визначення стадії пухлинного захворювання і його поширеність проводили за міжнародною системою TNM (7-видання, 2009 рік). У дослідну групу були включені хворі на РПК зі стадією перебігу хвороби $T_{1-4}N_{0-2}M_0$. Середній вік пацієнтів склав 56 ± 24 років і коливався від 32 до 80 років. Серед хворих були 61 жінка (45%) і 74 чоловіка (55%), у яких діагностовано аденокарциному різного ступеня злоякісності. Верифікація діагнозу

проводилася шляхом гістологічного дослідження біопсійного матеріалу прямої кишки до початку лікування, а також зразків післяопераційного матеріалу.

В роботі проаналізовано профіль експресії Е-кадгерину, Twist, ERCC1 і Торо II-α у пухлинних клітинах хворих на РПК. При оцінці експресії Е-кадгерину, Twist, ERCC1 і Торо II-α в пухлинних клітинах хворих на РПК не виявлено статистично значимий зв'язок між даними показниками та віком пацієнта, стадією захворювання, розміром і поширенням пухлини (категорія Т), ступенем поширеності пухлинного процесу за межі первинного вогнища у регіонарні лімфатичні вузли (категорія N), локалізацією пухлинного процесу та ступенем диференціювання пухлини. Лише серед хворих із поширенням пухлинного процесу, яке відповідало категорії Т₃, кількість пацієнтів із ERCC1-негативними пухлинами майже втричі перевищувала кількість таких із експресією даного маркера у ПК (75,7% проти 23,1%), а у 15,4% хворих із наявністю даного маркера у пухлині виявлено категорію Т₁. Водночас, аналіз перебігу захворювання та загальної 3-річної виживаності у даної групи хворих показав високу інформативність показників експресії Е-кадгерину, ERCC1 та Торо IIα і відсутність статистично достовірних результатів для Twist.

В роботі отримано дані щодо можливості прогнозування перебігу захворювання у хворих на РПК за допомогою оцінки маркерів, що співвідносять з інвазивним потенціалом злоякісно трансформованих клітин - Е-кадгерином, та лікарською резистентністю - ERCC1 і Торо II-α. При цьому використовуючи ряд статистичних методів, встановлено достовірність позитивного прогнозу щодо характеру перебігу пухлинного процесу та виживаності пацієнтів за наявності лише Е-кадгерин-позитивних клітин у пухлині, тоді як експресія у пухлинних клітинах Торо II-α та ERCC1 достовірно погіршує ці показники. Також в роботі доведено високу інформативність певних комбінацій фенотипових маркерів злоякісно трансформованих клітин, які свідчать про покращення або погіршення прогнозу перебігу захворювання

із, відповідно, збільшенням або зменшенням частоти і тривалості випадків безрецидивного періоду. Зокрема визначено, що достовірно інформативними показниками позитивного прогнозу тривалості безрецидивного періоду та загальної 3-річної виживаності хворих після проведеного комплексного лікування з використанням платиновмістної схеми хіміотерапії є наявність фенотипової комбінації маркерів Е-кадгерин⁺/ERCC1⁻ (p=0,012 і p=0,011 відповідно) та Е-кадгерин⁺/Торо II-α⁻ (p=0,159 і p=0,002). В свою чергу, виявлення в пухлинах Е-кадгерин⁻/ERCC1⁺ (p=0,001 і p=0,038 відповідно) та Е-кадгерин⁻/Торо II-α⁺ (p=0,001 і p=0,11) клітин асоційовано з погіршенням прогнозу перебігу захворювання та зниження загальної 3-річної виживаності хворих.

За оцінкою отриманих даних показана необхідність комплексного визначення профілю експресії Е-кадгерину, ERCC1 та Торо IIα при прогнозуванні перебігу пухлинного процесу у хворих на РПК, оскільки виявлено високу інформативність порогових значень рівня експресії Е-кадгерину, ERCC1 та Торо IIα при прогнозуванні перебігу захворювання (p=0,001, p=0,001 і p=0,190 відповідно) та загальної виживаності (p=0,002, p=0,026 і p=0,028 відповідно) хворих на РПК після застосування платиновмісних схем ХТ. За варіантом комбінації наявності/відсутності експресії відразу трьох маркерів - Е-кадгерину, ERCC1 та Торо IIα, у ПК сформовано групи пацієнтів із низьким – Е-кадгерин⁺/ERCC1⁻/Торо IIα⁻; підвищеним - Е-кадгерин⁻/ERCC1⁻/Торо IIα⁻; Е-кадгерин⁻/ERCC1⁻/Торо IIα⁺ та високим - Е-кадгерин⁺/ERCC1⁺/Торо IIα⁻; Е-кадгерин⁻/ERCC1⁺/Торо IIα⁺; Е-кадгерин⁺/ERCC1⁻/Торо IIα⁺; Е-кадгерин⁺/ERCC1⁺/Торо IIα⁺ ризиком продовження хвороби та зниження загальної виживаності після застосування платиновмісних схем ХТ.

За результатами роботи було оцінено алгоритм дослідження комплексу біомаркерів для підбору схем хіміотерапевтичного лікування у хворих на РПК. Застосування запропонованого алгоритму підбору індивідуалізованих схем ХТ

у хворих на РПК після проведеного радикального хірургічного лікування дозволило підвищити ефективність лікування хворих на РПК шляхом покращення як загальної, так і безрецидивної 3-річної виживаності, зниження виникнення прогресії захворювання, збільшення відсотка хворих без подовження хвороби у порівнянні із хворими, у яких використовували схеми ПХТ без попереднього визначення профілю експресії Е-кадгерину, ERCC1 і Торо II-α. Отримані дані показали достовірну значимість оцінки досліджуваних маркерів: при комплексно низькій експресії ERCC1, Торо II-α і високій Е-кадгерину спостерігається найбільш сприятливий прогноз щодо виживання після проведення комплексного лікування хворих на РПК з використанням платиновмісних схем хіміотерапії.

В дисертаційній роботі встановлено, що використання в комплексному лікуванні схеми FOLFIRI у пацієнтів з несприятливими прогностичними показниками експресії маркерів, залишається обгрунтовано ефективним. Таким чином, отримані дані дозволяють цілеспрямовано корегувати інтенсивність і обсяг планованого лікування пацієнта з РПК після оперативного втручання, отримавши максимально високу відповідь на проведену хіміотерапію.

Ключові слова: рак прямої кишки, індивідуалізація лікування, хіміотерапія, Е-кадгерин, Торо IIα, ERCC1, медикаментозна резистентність.

SUMMARY

Glyanko M.V. Individualization of combined treatment of patients with rectal cancer: molecular and biological aspects. - Manuscript.

The Thesis for the scientific degree of the candidate of medical sciences on specialty 14.01.07 - Oncology. – R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2021.

Although today there is a rapid increase in the number of chemotherapeutics and their inclusion in the treatment regimens of patients with rectal cancer (RC), but the median survival of patients is about 18 - 24 months. The choice of drug treatment for patients with RC is based, as a rule, on clinical guidelines developed by evidence-based medicine, the main disadvantage of which is the disregard for individual characteristics of both the body and the tumor, accompanied by reduced therapy. The peculiarity of a solid tumor is its heterogeneity: the course of the tumor process can develop differently even within a homogeneous group of patients, and the molecular profile, which is a unique characteristic of a particular patient's tumor, may change during disease development. Such changes lead to the emergence of new phenotypic features of the tumor, and information about the molecular genetic characteristics of the tumor becomes a necessary component in choosing the optimal therapy along with the main methods of examination. Therefore, there is no doubt about the need to move to personalized medicine for such patients with the assessment of molecular genetic prognostic and predictive markers, which will allow the correct use of the arsenal of cytostatic therapy and rational approach to the treatment of each individual.

There are a large number of markers of tumor process in RC: proliferating antigens, markers of tumor suppression, DNA synthesis and damage, growth factors and their receptors, proteins associated with invasion, migration and metastasis of malignant transformed cells, but the most molecular questions remain -genetic markers and their correlations with the effectiveness of treatment of patients with RC.

The dissertation is devoted to research of possibility of increase of efficiency of treatment of patients with RC by application of individualized schemes of

polychemotherapy (PCT) taking into account features of expression of certain biomarkers (associated with drug resistance and malignancy of tumors).

To predict the effectiveness of one of the standard adjuvant regimens of PCT FOLFOX-6 or FOLFIRI by determining the expression status of a number of markers of tumor cells, three groups of patients with RC were formed:

1) retrospective group - 50 patients in whom the study of the level of expression of adhesion proteins, markers of drug resistance in tumor cells and the adjuvant standard scheme of PCT FOLFOX-6;

2) prospective group of patients - 53 patients who were also studied the level of expression of adhesion proteins, markers of drug resistance in tumor cells and depending on the spectrum of markers used individualized regimens of chemotherapy FOLFOX-6 (30 patients) or FOLFIRI ;

3) control group of patients - 32 patients in whom the study of the level of expression of adhesion proteins, markers of drug resistance in tumor cells, and postoperative PCT was performed according to the standard scheme FOLFOX-6.

The stage of the tumor and its prevalence were determined according to the international TNM system (7th edition, 2009). The experimental group included patients with RC with the stage of the disease T1-4N0-2M0. The mean age of patients was 56 ± 24 years and ranged from 32 to 80 years. Among the patients were 61 women (45%) and 74 men (55%) who were diagnosed with adenocarcinoma of various degrees of malignancy. Verification of the diagnosis was performed by histological examination of biopsy material of the rectum before treatment, as well as samples of postoperative material.

The expression profile of E-cadherin, Twist, ERCC1 and Topo II- α in tumor cells of patients with RC was analyzed. There was no statistically significant relationship between these markers and the patient's age, disease stage, tumor size and spread (category T), the extent of the tumor outside the primary focus in regional lymph nodes (category N), the location of the tumor and the degree of differentiation tumors. Only among patients with the spread of the tumor process, which

corresponded to the T3 category, the number of patients with ERCC1-negative tumors almost three times higher than the number of those with the expression of this marker in tumor cells (75.7% vs. 23.1%), and 15.4% patients with the presence of this marker in the tumor revealed category T4. At the same time, the analysis of the course of the disease and the overall 3-year survival in this group of patients showed a highly informative expression of E-cadherin, ERCC1 and Topo II α and the lack of statistically significant results for Twist.

Data on the possibility of predicting the course of the disease in patients with RC by evaluating markers associated with the invasive potential of malignantly transformed cells - E-cadherin, and drug resistance - ERCC1 and Topo II- α . Using various statistical methods, the reliability of a positive prognosis for the nature of the tumor process and the survival of patients in the presence of only E-cadherin-positive cells in the tumor, while the expression in tumor cells Topo II- α and ERCC1 significantly worsens these indicators. The paper also proves the high informativeness of certain combinations of phenotypic markers of malignantly transformed cells, which indicate an improvement or deterioration of the prognosis of the disease with, respectively, an increase or decrease in the frequency and duration of recurrence-free cases. In particular, it was determined that the presence of a phenotypic combination of markers E-cadherin + / ERCC1 $^{-}$ ($p = 0.012$ and $p = 0.011$, respectively) and E-cadherin + / Topo II- α^{-} ($p = 0.159$ and $p = 0.002$) are reliable informative indicators of a positive prognosis the duration of the recurrence-free period and the overall 3-year survival of patients after comprehensive treatment using a platinum-containing chemotherapy regimen. In turn, the detection in cells of E-cadherin ER / ERCC1 + ($p = 0.001$ and $p = 0.038$, respectively) and E-cadherin $^{-}$ / Topo II- α + ($p = 0.001$ and $p = 0.11$) cells was associated with a worsening of the prognosis disease and reduced overall 3-year survival of patients.

Because the work revealed high informativeness of the threshold values of the expression level of E-cadherin, ERCC1 and Topo II α in predicting the course of the disease ($p = 0.001$, $p = 0.001$ and $p = 0.190$, respectively) and overall survival ($p =$

0.002, $p = 0.026$ and $p = 0.028$, respectively) of patients with RC after the use of platinum-containing chemotherapy regimens, such a comprehensive determination of the expression profile of E-cadherin, ERCC1 and Topo II α in predicting the course of the tumor process in patients with RC is further recommended. According to the variant of the combination of presence / absence of expression of three markers at once - E-cadherin, ERCC1 and Topo II α , groups of patients with low - E cadherin + / ERCC1- / Topo II α - were formed in tumor cells; elevated - E-cadherin- / ERCC1- / Topo II α -; E-cadherin- / ERCC1- / Topo II α + and high - E-cadherin + / ERCC1 + / Topo II α -; E-cadherin- / ERCC1 + / Topo II α +; E-cadherin + / ERCC1- / Topo II α +; E-cadherin + / ERCC1 + / Topo II α + risk of disease progression and reduced overall survival after platinum-containing chemotherapy regimens.

According to the results of the work, the algorithm of research of the complex of biomarkers for selection of chemotherapeutic treatment schemes in patients with RC was evaluated. The application of the proposed algorithm for the selection of individualized schemes of CT in patients with RC after radical surgical treatment has increased the effectiveness of treatment of patients with RC by improving both overall and recurrent 3-year survival, reducing disease progression by 1.47 times, increasing the percentage of patients without prolongation of the disease by 1.32 times compared with patients who used CT regimens without prior determination of the expression profile of E-cadherin, ERCC1 and Topo II- α . The obtained data showed the importance of evaluation of the studied markers: at complex low expression of ERCC1, Topoisomerase II α and high E-cadherin the most favorable prognosis for survival after complex treatment of patients with RC using platinum-containing chemotherapy regimens is observed.

In the dissertation work it is established that the use of FOLFIRI scheme in complex treatment in patients with unfavorable prognostic indicators of marker expression remains reasonably effective. Thus, the obtained data allow to purposefully adjust the intensity and volume of the planned treatment of a patient with RC after surgery, receiving the highest possible response to chemotherapy.

Key words: rectal cancer, individualization of treatment, chemotherapy, E-кадгерин, Торо II α , ERCC1, drug resistance.

Список публікацій здобувача

1. Н. О. Безденежных, В. Є. Жильчук, М. В. Глянько, І. М. Адаменко, Ю. Й. Кудрявец. Експресія в пухлинних клітинах маркерів епітеліально-мезенхімального переходу та білків лікарської стійкості в якості прогностичного показника у хворих на колоректальний рак / *Онкологія*. – 2016; 18, (1): 48-54. (Глянько М.В. - аналіз літературних джерел за темою дослідження, підготовка зразків для імуногістохімічного дослідження, участь у оформленні статті).
2. Ю.Й. Кудрявец, Н.О. Безденежных, Н.І. Семесюк, А.В. Жильчук, О.О. Лихова, О.А. Ковальова, А.Л. Воронцова, В.Є. Жильчук, М.В. Глянько, Ю.В. Жильчук, Р.А. Кочерга. Мікрооточення пухлинних клітин як джерело модифікаторів епітеліально-мезенхімального переходу та мішень для персоніфікованої терапії / *Онкологія* 2016; 18 (4): 269-276. (Глянько М.В. - аналіз вітчизняної та зарубіжної літератури за темою дослідження, узагальнення наведених в них даних, участь у написанні статті).
3. Максимьяк Г.И., Жильчук В.Е., Жильчук А.В., Чишкевич Ю.В., Кудрявец Ю.Й., Воронцова А.Й., Безденежных Н.А., Глянько М.В., Николаенко А.Н., Дзедман М.И. Эффективность препарата Эрбисол Ультрафарм в комплексном лечении пациентов с метастатическими поражениями печени. «Eurasian Journal of Oncology», 2016, volume 4, № 3: 696 – 709. (Глянько М.В. - аналіз вітчизняної та зарубіжної літератури за темою дослідження, клінічні спостереження, опрацювання клінічних результатів, участь у написанні статті).
4. Глянько М.В., Безденежных Н.А., Кудрявец Ю.И., Максимьяк Г.И., Жильчук А.В., Жильчук В.Е. Оценка наиболее информативных маркеров у больных колоректальным раком путем моделирования прогностической модели для определения вероятности прогрессирования заболевания / "Онкологический журнал общественного объединения "Белорусское

- общество онкологов"" - 2017 - 1 (11): 13-20. (Глянько М.В. - аналіз літературних джерел за темою дослідження, підготовка зразків для імуногістохімічного дослідження, аналіз та узагальнення статистичних даних, участь у оформленні статті).
5. М.В. Глянько, А.В. Жильчук, В.Е. Жильчук, Ю.И. Кудрявец, Г.И. Максимяк. Выбор схемы терапевтического лечения с использованием маркеров чувствительности у больных колоректальным раком – Онкология 2017 – 19 (2): 141 – 144. (Глянько М.В. - аналіз вітчизняної та зарубіжної літератури за темою дослідження, клінічні спостереження, опрацювання клінічних результатів, участь у написанні статті).
 6. Glyanko Mikhail, Bezdieniezhnykh Natalia, Kudryavets Yuri, Lykhova Alexandra, Zhylchuk Victor, and ather. Assessment of prognostic significance of E-cadherin and ERCC1 expression in colorectal cancer. JPPRI . July 2017 Vol.:9, Issue:9. P 31-38. (Глянько М.В. - аналіз літературних джерел за темою дослідження, клінічні спостереження, підготовка зразків для імуногістохімічного дослідження, аналіз та узагальнення статистичних даних, участь у оформленні статті).
 7. Glyanko M., Bezdieniezhnykh N., Zhylchuk V., Kudryavets Yu. Markers of epithelial-mesenchymal transition and drug resistance in tumors of patient with colorectal cancer. 7 th International Scientific Interdisciplinary Conference for medical students and young scientists, Kharkiv, Ukrain. - May 15-16, 2014.
 8. Глянько М.В., Безденежных Н.А., Жильчук В.Е., Кудрявец Ю.И., Адаменко И.Н. Информативность маркеров лекарственной устойчивости с белками адгезии клеток как потенциального прогностического комплекса течения опухолевого процесса у больных колоректальным раком. "Внесок молодих вчених і спеціалістів у розвиток медичної науки і практики: нові перспективи", 15.05.15, Харків: С.30.
 9. М.В. Глянько, В.Е. Жильчук, Ю.И. Кудрявец. Роль окремих маркерів лікарської стійкості в прогнозуванні ефективності лікування хворих на

колоректальний рак платиновмісними хіміопрепаратами – Онкологія
2015 – 17 (3): 206.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	17
ВСТУП	18
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	25
1.1. Захворюваність на рак прямої кишки та діагностика	25
1.2. Сучасні підходи до комплексного та комбінованого лікування хворих на рак прямої кишки	31
1.2.1. Хірургічне лікування хворих на рак прямої кишки	31
1.2.2. Роль променевої терапії в лікуванні хворих на рак прямої кишки в сучасних умовах	34
1.2.3. Стандартне та індивідуалізоване медикаментозне лікування хворих на рак прямої кишки	35
1.3. Клінічна значимість дослідження експресії в пухлинних клітинах молекулярних маркерів, як основа для індивідуалізованого медикаментозного лікування хворих на рак прямої кишки	39
1.3.1. Дослідження експресії в пухлинних клітинах молекулярних маркерів лікарської резистентності як основа протипухлинної терапії. Традиційні маркери лікарської резистентності	39
1.3.2. Дослідження експресії в пухлинних клітинах топоізомерази II альфа та ERCC1 як підстава для індивідуалізації медикаментозного лікування	44
1.3.3. Дослідження експресії маркерів, які характеризують епітеліально-мезенхімальний перехід злоякісно-трансформованих клітин	46
1.3.4. Білки адгезії та клітинного цитоскелету в прогресії РПК. Маркери епітеліально-мезенхімального переходу злоякісно-трансформованих клітин РПК	48
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	57
2.1. Клініко-морфологічна характеристика хворих	57
2.2. Характер променевого та хірургічного втручання	60
2.3. Характер медикаментозного лікування	61

2.4. Імуногістохімічні методи	66
2.5. Статистична обробка результатів	68
РОЗДІЛ 3. АНАЛІЗ ПЕРЕБІГУ ЗАХВОРЮВАННЯ У ХВОРИХ НА РАК ПРЯМОЇ КИШКИ В ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД ЕКСПРЕСІЇ МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНИХ МАРКЕРІВ ЛІКАРСЬКОЇ РЕЗИСТЕНТНОСТІ	71
3.1. Загальна характеристика хворих ретроспективної групи	72
3.2. Дослідження взаємозв'язку між експресією маркерів ЕМП пухлинних клітин та білками лікарської резистентності з метою оцінки прогнозу перебігу захворювання у хворих на рак прямої кишки	75
3.3. Дослідження комплексів антигенів, що характеризують імунофенотип пухлинної клітини раку прямої кишки	95
3.4. Визначення групи підвищеного ризику на основі рівня експресії маркерів пухлинних клітин	103
Висновки до розділу 3	110
РОЗДІЛ 4. ПОРІВНЯЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ІНДИВІДУАЛІЗОВАНИХ І СТАНДАРТНИХ СХЕМ ХІМІОТЕРАПІЇ У ХВОРИХ НА РАК ПРЯМОЇ КИШКИ	112
4.1. Індивідуалізація лікування хворих на рак прямої кишки шляхом застосування схем поліхіміотерапії із врахуванням експресії молекулярно-біологічних маркерів лікарської резистентності	112
4.2. Застосування препарату ЕРБІСОЛ Ультра-фарм в поєднанні із хіміотерапією у хворих на РПК із метастатичним ураженням печінки	122
Висновки до розділу 4.	128
РОЗДІЛ 5. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	129
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	139

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АТФ – аденозинтрифосфат

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

ДІ – довірений інтервал

ЕМП – епітеліально-мезенхімальний перехід

РПК – рак прямої кишки

КТ – комп'ютерна томографія

МКАТ – моноклональне антитіло

мРПК – метастатичний колоректальний рак

ПК – пухлинні клітини

ПХТ – поліхіміотерапія

РПК – рак прямої кишки

ТЕМ – трансанальна ендоскопічна мікрохірургія

ТГТ - телегаматерапія

УЗД – ультразвукове дослідження

ВШ – відношення шансів

ШКТ – шлунково-кишковий тракт

DPD – дигідропіримідин-дигідрогеназа

Актуальність роботи. На сьогодні в Україні, як і у всьому світі, спостерігається ріст захворюваності на рак прямої кишки (РПК), чому сприяє стрімка урбанізація та глобалізація технократичного суспільства. Висока смертність серед даної категорії хворих обумовлена, в першу чергу, відсутністю ефективних скринінгових програм раннього виявлення пухлин, специфікою клінічного перебігу, синхронним метастазуванням. Згідно даних Національного канцерреєстру в 2018 році зареєстрований показник загальної кількості захворювання на РПК склав 19,2 випадки на 100 тисяч населення, що відповідає європейським і світовим тенденціям [[http: // www.ncru.inf.ua/publications/ BULL_20/ PDF/30-31-pka.pdf](http://www.ncru.inf.ua/publications/BULL_20/PDF/30-31-pka.pdf)].

За останні роки внаслідок значного прогресу в галузі фундаментальної онкології ідентифіковані та охарактеризовані ключові механізми канцерогенезу, досліджено експресію окремих маркерів злоякісно трансформованих клітин, що функціонально пов'язані з їх біологічними властивостями та чутливістю до протипухлинних впливів. При цьому стало зрозумілим, що РПК є гетерогенним захворюванням як за агресивністю перебігу пухлинного процесу, так і за відповіддю на хіміотерапевтичні агенти.

Не дивлячись на те, що впродовж останнього десятиріччя спостерігається стрімке збільшення арсеналу хіміопрепаратів та їх включення в схеми лікування, медіана виживаності хворих складає близько 18 - 24 міс (P. Rawla et al., 2019; F.Brady et al., 2018; M. Arnold et al., 2018). При цьому виживаність хворих була і залишається провідним показником якості їх лікування. Вибір медикаментозного лікування хворих на РПК ґрунтується, як правило, на клінічних рекомендаціях, розроблених доказовою медициною, основним недоліком яких є відсутність урахування індивідуальних особливостей як організму, так і пухлини, що супроводжується зниженням очікуваної ефективності лікування поряд із збільшенням токсичних проявів.

Оскільки сьогодні відсутні абсолютні ознаки чутливості та резистентності пухлини до терапевтичних препаратів, без урахування яких ймовірність

помилки при виборі терапії для конкретного хворого достатньо висока, то не викликає сумніву необхідність переходу до персоналізованої медицини із оцінкою молекулярно-генетичних прогностичних та предиктивних маркерів. Такий підхід дозволить вірно використовувати арсенал цитостатичної терапії та раціонально підійти до лікування кожної окремої людини (В.Ф.Чехун 2012; M. Duffy 2015; D. Graham et al., 2016).

Існує велика кількість потенційних маркерів перебігу пухлинного процесу: антигени проліферації, маркери пухлинної супресії, синтезу і пошкодження ДНК, фактори росту і їх рецептори, білки, що асоційовані з інвазією, міграцією та метастазуванням злоякісних клітин (F. Sinicrope et al., 2016; M.Sideris et al. 2014). Втім, лишаються питання про найбільш інформативні прогностичні молекулярно-біологічні маркери, що відображають ефективність лікування хворих. Відбір панелі саме таких маркерів дав би можливість створення адекватного алгоритму протипухлинної терапії хворих.

Особливістю солідної пухлини є її біологічна неоднорідність або гетерогенність (Z.Zhai et al., 2017; A. Albini et al., 2015): перебіг пухлинного процесу може розвиватись по різному навіть у межах однорідної групи пацієнтів, при цьому молекулярний профіль, що є унікальною характеристикою пухлини конкретного хворого, може змінюватися протягом розвитку захворювання. Такі зміни обумовлюють появу нових фенотипових особливостей пухлини, а інформація про молекулярно-біологічну характеристику пухлини стає необхідним компонентом при виборі оптимальної терапії нарівні з основними методами обстеження. Враховуючи вищевказані проблеми, ми вважали за доцільне зосередити свою увагу на пошуку прогностичних і предиктивних маркерів пухлинних клітин (ПК) для диференційного підходу при індивідуалізованому виборі схем лікування хворих на РПК.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційна робота виконана в Інституті експериментальної патології, онкології і радіобіології ім.Р.Є.Кавецького НАН України у відповідності до плану науково-дослідних робіт Інституту за наступними темами: 2.2.5.225 «Клітинний банк ліній з тканин людини та тварин. Збереження та забезпечення належного функціонування клітинного банку як об'єкту НН. Характеристика нових клітинних моделей» (2009-2013 рр.); 2.2.5.365 «Роль мікрооточення пухлинних клітин у контролі організмом поведінки «прихованих» мікрометастазів» (2012-2016 рр.; державний реєстраційний номер 0112U002193); 2.2.5.385 «Пригнічення злоякісного фенотипу пухлинних клітин шляхом модифікації програми епітеліально-мезенхімального переходу біологічно активними чинниками» (2014-2016 рр.; державний реєстраційний номер 0113U008332) та на базі КНП «Обласне територіальне медичне об'єднання м.Краматорська» МОЗ України.

Мета: Підвищення ефективності лікування хворих на рак прямої кишки шляхом застосування індивідуалізованих схем поліхіміотерапії із урахуванням особливостей експресії маркерів, асоційованих із чутливістю/резистентністю до протипухлинних чинників та ступенем злоякісності пухлин.

Задачі дослідження:

1.Дослідити експресію білків, асоційованих із чутливістю/резистентністю до протипухлинних чинників - ERCC1, Торо Па, та маркерів, що опосередковують адгезивні властивості клітин – Е-кадгерин, Twist, у пухлинних клітинах хворих на РПК з урахуванням клініко-морфологічної характеристики хворих, клінічним перебігом захворювання та 3-річною загальною виживаністю.

2.Проаналізувати експресію різних варіантів комбінацій наявності/відсутності експресії маркерів, що обумовлюють медикаментозну стійкість та адгезивні властивості пухлинних клітин, та визначити їх інформативність при прогнозуванні клінічного ефекту після проведеного

комплексного лікування з використанням платиновмісної схеми хіміотерапії чи поліхіміотерапії у хворих на РПК.

3. Визначити інформаційність порогових значень рівня експресії Е-кадгерину, Торо ІІа та ERCC1 і сформувати групи хворих із різним ступенем ризику виникнення прогресії захворювання після застосування платиновмісної схеми хіміотерапії чи поліхіміотерапії.

4. Індивідуалізувати схеми медикаментозного лікування хворих на РПК після проведеного радикального хірургічного лікування, зважаючи на профіль експресії досліджуваних маркерів чутливості/резистентності до хіміопрепаратів та адгезії.

5. Порівняти ефективність лікування індивідуалізованої та стандартної поліхіміотерапії на основі препаратів платини у хворих на РПК після проведеного радикального хірургічного лікування.

Об'єкт дослідження – рак прямої кишки..

Предмет дослідження – зв'язок між профілем експресії маркерів, що визначають адгезивний потенціал пухлинних клітин, чутливість/резистентність до дії хіміопрепаратів, та клінічною ефективністю різних схем поліхіміотерапії у комплексному лікуванні хворих на РПК.

Методи дослідження: загальні клінічні дослідження проводили для характеристики хворих, формування груп порівняння та подальшої оцінки зв'язку експресії маркерів із клінічними характеристиками хворих (вік, стадія, стать та ін.). Стадію захворювання та характер поширення пухлинного процесу оцінювали шляхом проведення КТ органів грудної клітки, органів черевної порожнини, органів малого тазу до початку лікування, МРТ органів малого тазу, ультразвукового дослідження органів черевної порожнини, а також трансректального дослідження структури прямої кишки. Дослідження експресії Е-кадгерину, Торо ІІа, ERCC1, Twist проводили на парафінових зрізах

біопсійного та операційного матеріалу імуногістохімічним методом. Статистичні методи аналізу використовували для оцінки достовірності відмінностей показників експресії досліджених маркерів та клініко-морфологічних параметрів.

Наукова новизна отриманих результатів.

Набули подальшого розвитку питання щодо персоніфікованого лікування хворих на РПК, які базуються на впровадженні індивідуалізованих схем поліхіміотерапії (ПХТ) із урахуванням експресії маркерів чутливості/резистентності до дії хіміопрепаратів та адгезії.

Доповнено наукові дані щодо можливості прогнозування перебігу захворювання у хворих на РПК за допомогою оцінки маркерів, що співвідносять з інвазивним потенціалом злоякісних клітин - Е-кадгерином, та лікарською резистентністю - ERCC1 і Торо Па. Використовуючи ряд статистичних методів, встановлено достовірність позитивного прогнозу щодо характеру перебігу пухлинного процесу та виживаності пацієнтів за наявності лише Е-кадгерин-позитивних клітин у пухлині, тоді як наявність Торо Па та/або ERCC1 в ПК достовірно погіршує ці показники.

Доведено високу інформативність певних комбінацій фенотипових маркерів ПК, які свідчать про покращення (Е-кадгерин⁺/ERCC1⁻, Е-кадгерин⁺/Торо Па⁻) або погіршення прогнозу (Е-кадгерин⁻/ERCC1⁺ та Е-кадгерин⁻/Торо Па⁺) перебігу захворювання із, відповідно, збільшенням або зменшенням частоти і тривалості випадків безрецидивного періоду.

Вперше показано значимість комплексного врахування статусу експресії Е-кадгерину, Торо Па та ERCC1 при формуванні груп підвищеного ризику виникнення прогресії захворювання серед хворих на РПК. Вперше науково обґрунтовано доцільність застосування індивідуалізованих платиновмістних схем ПХТ після проведеного радикального хірургічного лікування хворих із Е-кадгерин⁺/ERCC1⁻/Торо Па⁻ фенотипом ПК. В той же час наявність експресії

хоч би одного із маркерів чутливості/резистентності до хіміопрепаратів значно підвищує ймовірність погіршення виживаності хворих.

Практичне значення отриманих результатів.

На основі даних дисертаційної роботи виділено найбільш інформативні прогностичні маркери, асоційовані з інвазивним потенціалом клітин та лікарською резистентністю, щодо перебігу пухлинного процесу та індивідуальної корекції стратегії лікування хворих на РПК. Отримані дані дозволяють цілеспрямовано скорегувати інтенсивність і обсяг планованого лікування пацієнта з РПК після оперативного втручання, отримавши максимально високу відповідь на проведену ПХТ. Результат використання алгоритму підбору схем хіміотерапевтичного лікування у хворих на РПК із урахуванням варіанта комбінації наявності/відсутності експресії найбільш інформативних імунофенотипових характеристик клітин, таких як Е-кадгерин, Торо Па та ERCC1, дозволив знизити ризик виникнення прогресії захворювання у пацієнтів. Згідно показників загальної 3-річної виживаності та характеру перебігу захворювання найбільш ефективним є застосування платиновмістних схем ПХТ у хворих на РПК із фенотипом ПК Е-кадгерин+/ERCC1–/Торо Па–. Результати дослідження впроваджені у ряді закладів МОЗ України, зокрема Львівському клінічному регіональному онкологічному центрі, Прикарпатському клінічному онкологічному центрі, Рівненському обласному протипухлинному центрі, Краматорському онкологічному диспансері.

Особистий внесок здобувача. Автор планував дисертаційну роботу за допомогою наукових керівників, виконував наукові дослідження та проводив клінічні дослідження, проводив хірургічне лікування та приймав участь в операціях хворих на РПК, розроблював варіанти ад'ювантної ПХТ. Дисертант самостійно проводив статистичну обробку отриманих даних; брав участь в теоретичному узагальненні результатів та порівнював їх з даними літератури,

здійснював підготовку матеріалів, що висвітлюють результати досліджень для їх публікацій, а також брав участь у підготовці матеріалу і формулюванні основних наукових положень та висновків дисертації.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації були представлені та обговорені на: 7th International Scientific Interdisciplinary Conference for medical students and young scientists (Kharkiv, 2014), науково-практичній конференції “Внесок молодих вчених і спеціалістів у розвиток медичної науки і практики: нові перспективи” (Харків, 2015), Науково-практичній конференції “Мінімальна залишкова хвороба при солідних пухлинах (Київ, 2015); науково-практичній конференції “Індивідуалізація медикаментозного лікування хворих на солідні пухлини (Рівне, 2018). **Публікації.** За темою дисертаційної роботи опубліковано 9 наукових робіт, зокрема 6 статей в наукових фахових виданнях, затверджених МОН України, серед яких 3 статей в журналах, що включені до міжнародних наукометричних баз, 3 тез матеріалів наукових конференцій та з’їздів.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 168 сторінках машинописного тексту і складається із вступу, огляду літератури, розділу матеріалів і методів дослідження, 5 підрозділів результатів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів власних досліджень, висновків та списку літератури, який включає 194 посилань, у тому числі 168 зарубіжних. Дисертаційна робота ілюстрована 23 рисунками та 51 таблицею.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Захворюваність на рак прямої кишки та діагностика

Рак прямої (РПК) та ободової кишки (колоректальний рак (КР)) сьогодні можна без перебільшення визначити як проблему світового масштабу. Відомо, що на 1-му місці за захворюваністю серед чоловіків є рак легені, серед жінок - рак молочної залози. РПК поступово виходить на 2-е місце, маючи тенденцію до безперервного зростання захворюваності. Ця тенденція особливо виражена в індустріально розвинених країнах. За даними ВООЗ, щорічно в світі реєструється близько одного мільйона нових випадків хворих РПК, при цьому більше 150 тисяч випадків захворювання припадає на США, смертність від РПК в якій знаходиться на 3 місці. Подібна картина спостерігається і в країнах Європейського Союзу: серед інших локалізацій злоякісних пухлин РПК має дуже високі темпи зростання, за якими знаходиться на 2 місці в світі [1, 2, 11].

В Україні згідно даних Національного канцерреєстру в 2017 році зареєстрований показник загальної кількості захворювання РПК – 7588, а в 2018 – 19,2 випадки на 100 тисяч населення, що відповідає європейським і світовим тенденціям [http://www.ncru.inf.ua/publications/BULL_20/PDF/30-31-rka.pdf]. У чому причина такого стрімкого зростання цієї патології та чому виникає рак прямої та ободової кишки? Відповідь на це питання знаходиться в площині характеру харчування хворих, умов їх життя, що визначаються стрімкою урбанізацією та глобалізацією технократичного суспільства. РПК нерівномірно поширений серед жителів планети. Так, у країнах Західної Європи та США захворюваність складає 30 - 40 випадків на 100 тисяч населення, а в країнах Африки та Азії - всього – 3 - 4 випадки. Як показали дослідження, справа тут не в етнічному чиннику, серед емігрантів з країн Азії та Африки захворюваність на рак прямої та ободової кишки відповідає

захворюваності корінного населення цих країн. Які ж особливості харчування відзначені в країнах з високим рівнем захворюваності на рак прямої та ободової кишки? Це, перш за все надмірність споживання продуктів харчування над потребою людини, або простіше кажучи, переїдання. Встановлено, що ризик розвитку раку прямої та ободової кишки підвищується на 2,3% з кожними 100 калоріями, спожитими понад норму. Встановлено, що велике значення при цьому має і склад їжі - велику роль відіграє вживання тваринних жирів, м'яса і клітковини. Вживання тваринних жирів і м'яса стимулює розвиток раку прямої та ободової кишки, у той час як вживання клітковини знижує ризик захворюваності [3, 4, 12].

На жаль, до цих пір близько третини всіх випадків колоректального раку виявляється в запущених стадіях захворювання. Недоліки в діагностиці та лікуванні призводять до того, що 35-45% всіх хворих із злоякісними пухлинами прямої та ободової кишки не проживають і року з моменту встановлення діагнозу. Таким чином, надання допомоги хворим на рак товстої кишки залишається важливою проблемою для системи охорони здоров'я України. Найбільш актуальними питаннями є своєчасна діагностика і надання адекватного спеціального лікування, що сприяє збільшенню виживаності хворих на рак товстої кишки (середньоєвропейський показник п'ятирічної загальної виживаності - 50 %).

Факторами ризику для РПК виступають наступні захворювання: виразковий коліт, особливо панколіт з давністю захворювання більше 10 років; хвороба Крона; аденома товстої кишки в анамнезі; синдром поліпозу: дифузний сімейний поліпоз, поодинокі та множинні поліпи; пухлини жіночих репродуктивних органів або молочної залози в анамнезі; синдроми сімейного раку; іммунодефіцити.

Наразі виділяють декілька типів пухлин РПК за характером їх росту: екзофітні, ендофітні пухлини та змішані. *Екзофітні пухлини* мають чіткі контури, ростуть в просвіті прямої кишки. До них відносять поліповидний рак

(пухлина на широкій або вузькій основі, виступає в просвіт кишки), бляшковидний (пухлина на широкій основі, з пласкою поверхнею, незначно виступає в просвіт кишки), ворсинчасто-папілярний рак (бугриста пухлина дольчатої будови). *Ендофітні пухлини* характеризуються внутрішньостінковим ростом; пухлина вражає стінку прямої кишки різною мірою проникаючи в її товщу (дифузно - інфільтративний рак) і звужуючи просвіт кишки, межі пухлини чітко не визначаються. На окремих ділянках можуть виникати виразки (ендофітний - виразковий рак).

Змішаний тип пухлини прямої кишки характеризується тим, що поряд з ростом її в просвіт кишки відбувається інфільтрація стінки на відносно великій відстані. Змішаним ростом володіє блюдцеподібний рак, що представляє собою овальної або круглої форми виразку з щільними, горбистими, валікообразно піднятими краями.

Гістологічна структура раку прямої кишки різна, проте у переважної більшості хворих пухлина є аденокарциномою, рідше – пухлина слизової (зазвичай характеризується ендофітним ростом), солідний рак, пласкоклітинний, недиференційований (з інфільтруючим ростом) або фіброзний рак. Особливо високим ступенем злоякісності володіють пухлини слизової, солідний та недиференційований рак [5].

Гістологічна класифікація РПК.

Злоякісні пухлини	Частота, %
Аденокарцинома	90-95%
Муциозна аденокарцинома	10%
Перстневидно-клітинна карцинома	4%
Сквамозно-клітинна карцинома	<1%
Аденосквамозна карцинома	<1%
Недиференційована карцинома	<1%
Некласифікуєма карцинома	<1%

Метастазування РПК: ураження лімфатичних вузлів стінки кишки; ураження внутрішньотазових лімфатичних вузлів; гематогене метастазування (частіше у печінку і легені).

Принцип онкології - чим раніше виявлено пухлинний процес, тим ефективніше його лікування, повною мірою відноситься і до РПК. На ранніх стадіях розвитку аденоматозні поліпи і колоректальні карциноми є безсимптомними. Найбільш доступним, дешевим і простим методом їх виявлення є гемокультний тест або дослідження калу на приховану кров. Він ґрунтується на тому, що колоректальні карциноми травмуються і виділяють в просвіт кишки кров, яка часто не визначається макроскопічно, але може бути визначена спеціальними методами дослідження – гемокульттестом: дослідження формально здорового населення показують позитивний гемокультний тест у 3-6% обстежених, при цьому рак виявляється в 10%, а поліпи - в 20-40%, однак в 50-70% випадків він буває хибнопозитивним. Незважаючи на низьку специфічність цього тесту, масове його використання, на думку фахівців, може дозволити знизити смертність від РПК на 30%. Іншим методом ранньої діагностики раку прямої та ободової кишки є ендоскопічне дослідження товстої кишки - колоноскопія. Цей метод дозволяє виявити колоректальний рак в I стадії у 80% хворих; своєчасно проведена ендоскопічна ексцизія поліпів є профілактикою їх малігнізації, а ендоскопічне лікування аденокарцином в I стадії призводить до 15-річної виживаності у 90% хворих. Американська асоціація лікарів рекомендує проведення гемокультного тесту 1 раз на рік, а колоноскопію - раз в 3-5 років у осіб після 50 років. Сучасні методики відеокколоноскопії дозволяють документувати всі зміни з боку слизової оболонки товстої кишки та архівувати матеріал. Подальше вдосконалення колоноскопії призвело до появи хромоколоноскопії - методу, що дозволяє виявляти на тлі пофарбованої слизової оболонки кишечника дуже маленькі поліпи - 0,1-0,2 см, які не виявляються при звичайній колоноскопії.

Для видалення таких утворень розроблена методика ендоскопічної мукозектомії.

Ще один напрям у ранньому виявленні раку прямої та ободової кишки засновано на визначенні рівнів циркуляції специфічних маркерів [9,10], таких як (РЕА) ракового-ембріонального антигену - пептиду, виділеного з ембріональних клітин шлунково-кишкового тракту. Було встановлено, що його підвищення (більше 6 мкг / літр) відзначається у хворих із злоякісними пухлинами товстої кишки, матки, молочної залози. У дослідженнях російських вчених було показано, що підвищення рівня РЕА в крові спостерігалось у 38% хворих з поліпами і збільшувалось по мірі наростання анаплазії і збільшення розмірів пухлини. Так при 1-2 стадіях (за класифікацією UICC) збільшення рівня РЕА було вже у 52% хворих, а при 4 стадії - у всіх хворих. Визначення РЕА знайшло широке застосування в динамічному спостереженні за хворими - різке підвищення його рівня в сироватці крові хворого знаходиться під спостереженням і свідчить про появу рецидиву захворювання і має спонукати лікаря до його клінічної та морфологічної верифікації. Майбутнє в ранній діагностиці колоректального раку очевидно буде належати генетичному неінвазивному скринінгу РПК, що заснований на тому, що клітини раку прямої та ободової кишки виділяються з калом, в якому їх можна виявити і провести дослідження мутантних генів (K-RAS, TP-53 та ін.). На даний же час РПК діагностується в 3-4 стадіях (за класифікацією міжнародного протиракового союзу - UICC) в 70% випадків, що вимагає визнання ранньої діагностики цього захворювання незадовільною [6, 7].

СА-19-9 - ще один широко розповсюджений маркер, що має прогностичне значення при раку товстої кишки: якщо його рівень перевищує 37 од / мл. - ризик смерті протягом 3 років після операції збільшується в 4 рази в порівнянні з тими хворими, у яких цей показник негативний або нижчий [6,7,8].

СА-242 - на сьогоднішній день один з основних маркерів, що використовується для діагностики та моніторингу раку підшлункової залози,

товстого кишечника і прямої кишки. Епітоп CA-242 експресується на тому ж муциновому апопротеїні, що і CA19-9 - Sialyl Lewis (SLea). Залежно від природи пухлини - доброякісної або злоякісної експресія епітопів CA-242 і SLea має відмінності: у доброякісних пухлинах експресія CA-242 низька, у той час як у випадку злоякісних пухлин його експресія значно вище в порівнянні з SLea, тому й специфічність CA-242 в порівнянні з CA-19-9 набагато вище. CA-242 - унікальний маркер, що дозволяє проводити діагностику вже на ранніх стадіях захворювання; при доброякісних захворюваннях можливі тільки поодинокі випадки підвищення рівня CA-242. Так, за результатами досліджень, менше 6% пацієнтів з доброякісними пухлинами або запальними процесами ШКТ мають незначне підвищення CA-242. При діагностиці раку товстого кишечника і прямої кишки CA-242 також є більш чутливим, ніж інші онкомаркери: при специфічності тесту 90% чутливість становить 40%, в той час, як чутливість тесту CA-19-9 і CA-50 - 23%. Практика показала, що серійні визначення CA-242 дозволяли виявити розвиток рецидивів колоректального раку за 5-7 місяців до клінічного виявлення. Комплексне використання CA-242 і CA-19-9 не збільшує чутливості тесту в порівнянні з використанням тесту CA-242 окремо; за різними даними за допомогою тесту CA242 вдається прогнозувати розвиток рецидивів колоректального раку за 5-6 місяців. Висока специфічність CA-242 дозволяє успішно використовувати тест для диференційної діагностики злоякісних і доброякісних гепатобіліарних захворювань. Комбінація онкомаркерів CA-242 + РЕА підвищує чутливість тесту на 25-40% в порівнянні з використанням моноаналізу на CA-242: при обстеженні хворих після лікування використання комбінації тестів CA-242 і РЕА дає можливість раніше виявити рецидив захворювання, при цьому чутливість збільшується на 20% порівняно з використанням тесту РЕА окремо [5, 8, 9].

1.2. Сучасні підходи до комплексного та комбінованого лікування хворих на рак прямої кишки

1.2.1. Хірургічне втручання при раку товстої кишки – є методом вибору, що залежить від локалізації пухлини, наявності ускладнень або метастазів, загального стану хворого [13, 14]. При відсутності ускладнень (перфорація або непрохідність) та віддалених метастазів виконують радикальну операцію - видалення уражених відділів разом з брижейкою і регіонарним лимфатичним апаратом. Радикальні операції при РПК спрямовані на лікування хворого шляхом видалення пухлини і регіонарних лімфатичних вузлів. Найчастіше використовують черевно-промежину екстирпацію прямої кишки, передню резекцію прямої кишки, черевно-анальну резекцію прямої кишки з низведенням сигмовидної ободової (або поперечної ободової) кишки, операцію Гартманна (обструктивна резекція). Вибір методу радикальної операції при раку прямої кишки визначається головним чином відстанню пухлини від анального отвору. При локалізації пухлини на відстані менше 6-7 см. від заднього проходу вдаються до черевно-промежиної екстирпації прямої кишки. Розташування пухлини на відстані більше 6-7 см. від заднього проходу робить можливим виконання сфінктерозберігаючих операцій (черевно-анальна резекція з низведення сигмовидної кишки). При розташуванні пухлини вище 10 - 12 см від заднього проходу доцільна передня резекція прямої кишки. Операцію Гартманна (обструктивну резекцію прямої кишки) проводять при розташуванні пухлини вище 10 - 12 см. від заднього проходу та неможливості виконання з тих чи інших причин передньої резекції прямої кишки. При виборі методу радикальної операції при раку прямої кишки, слід враховувати також конституціональні особливості хворого, наявність і тяжкість супутніх захворювань. При кожному виді операції може бути використаний як метод полостного втручання, так і лапароскопічний спосіб проведення операції. Останнім часом все частіше в практиці впроваджується варіант накладання

апаратного анастомозу. В разі лапароскопічного втручання ризик виникнення післяопераційних ускладнень значно зменшується, також скорочується час перебування пацієнта в клініці після операції. Використання зшиваючих апаратів дозволяє з одного боку скоротити час накладання міжкишкового анастомозу, та разом с тим зменшити ризик післяопераційних ускладнень.

Метою паліативних операцій є лише продовження життя хворого і зменшення його страждань. Їх виконують при розвитку виражених симптомів кишкової непрохідності та неможливості виконання радикальної операції.

В останні роки, для лікування ранніх стадій раку прямої кишки була запропонована і впроваджена в практику методика трансанальної ендоскопічної мікрохірургії (ТЕМ), що дозволяє лікувати пухлинні ураження зі ступенем інвазії пухлиною стінки кишки T1 - T2 в ніжнеампулярном відділі прямої кишки на висоті 12 см від зубчастої лінії, що відокремлює анальний канал від ампули прямої кишки. Ця методика передбачає наявність спеціального комплексу інструментів для її проведення і не може бути використана без попереднього трансректального УЗД прямої кишки, за допомогою якого визначається ступінь інвазії пухлиною стінки кишки і виключаються метастази в регіонарні лімфатичні вузли. Використання ТЕМ без перебільшення є «проривом» у лікуванні ранніх стадій раку прямої кишки.

Перспективним підходом до хірургічного лікування хворих на РПК є застосування малоінвазивних технологій, зокрема - лапароскопічних операцій. Перевагою таких втручань є зменшення кількості післяопераційних ускладнень, зниження вираженості больового синдрому та зменшення потреби в наркотичних анальгетиків, можливість ранньої реабілітації хворих. За попередніми даними більшості авторів віддалені результати лікування не поступаються таким після використання резекцій прямої кишки виконаних за допомогою лапаротомних доступів, проте слід зазначити, що до 40% лапароскопічних втручань з приводу колоректального раку таки закінчуються лапаротомним доступом.

Досить складним продовжує залишатися питання про лікування метастатичного раку прямої кишки. Серед вперше виявлених хворих 25% мають віддалені метастази, а серед хворих після радикального лікування вони виникають в 50% випадків. Найбільш часто РПК метастазує в печінку, потім в легені і кістки. Не викликає сумніву пріоритетність хірургічного лікування поодиноких метастазів раку прямої кишки в печінку і легені. Хірургічне лікування метастазів в печінці може бути одномоментним (одночасне видалення первинної пухлини і метастазів у печінці) і двухмоментним (спочатку видалення первинної пухлини, а через 2-3 місяці - видалення метастазів в печінці) [15]. Широкому впровадженню хірургічного методу лікування метастазів у печінку в практику сприяв розвиток нових технологій розділення тканин печінки за допомогою ультразвукового деструктора-аспіратора, гармонійного скальпеля та ін, а також технологій зупинки паренхіматозної кровотечі за допомогою аргано-плазмового коагулятора, тахокомба.

В останні роки, у зв'язку з появою нових, більш ефективних протипухлинних препаратів (оксаліплатин, іринотекан, кселода, авастин, Ербітукс), з'явилося поняття циторедуктивної хірургії, яке можна застосувати і до хворих з метастазами РПК і передбачає максимально можливе видалення метастатичних вузлів з подальшим проведенням хіміотерапії.

У клініці найчастіше має місце застосування рівноцінних схем хіміотерапії з використанням оксаліплатина та іринотекана, в таких схемах як FOLFOX, FOLFIRI, XELOX [16, 17]. Ефективність кожної зі схем багато разів доведена клінічно протягом десятків років досліджень та визнано кращими у виборі методу хіміотерапевтичного лікування. Проте варто зауважити, що позитивну відповідь на лікування, що проводиться з участю даних схем, не перевищує 50%, це змушує нас замислитися про пошук нових методів і схем лікування хворих на РПК, або шукати варіанти вибору даних схем у кожного конкретного хворого. На цей час, в основу призначення тієї чи іншої схеми

хіміотерапевтичного лікування, полягає вільний вибір лікаря хіміотерапевта, який керується своїм досвідом спостережень у площині переносимості та ускладнень після проведення хіміотерапії. Лікар не має на сьогоднішній день жодного варіанту виділити пріоритетну схему лікування для кожного хворого окремо. Принципово важким завданням є відповідь на питання рівноцінності схем хіміотерапії при РПК: може виявитися, що буде виділена група пухлин повністю резистентних до дії будь-якої з представлених схем, але в цьому випадку саме варіант пошуку даних пухлин дозволить вже на ранніх етапах лікування шукати альтернативні методи з участю таргетної групи препаратів, метронічних схем хіміотерапії, імунотерапії, вакцинації та ін..

1.2.2. Роль променевої терапії в лікуванні хворих на рак прямої кишки в сучасних умовах. Як правило променева терапія застосовується до операції, що дозволяє зменшити розміри пухлини, а також скоротити можливість осіменіння злоякісними клітинами черевної порожнини під час проведення операції [18, 19]. Після операції променева терапія використовується для запобігання рецидиву захворювання. В цілому застосування променевої терапії дозволяє в 2 рази зменшити число місцевих рецидивів РПК після хірургічного втручання: частота таких рецидивів без проведення радіотерапії становить 15-30%. Проведення передопераційної променевої терапії в поєднанні з хіміотерапією стало стандартом лікування РПК в країнах Європи, оскільки в дослідженнях такі схеми лікування продемонстрували високі показники ефективності і менш виражені прояви токсичності в порівнянні зі схемами, які передбачають післяопераційне опромінення. [20]. Сучасні технології променевої терапії дозволяють отримати позитивну відповідь на проведене лікування (повна регресія пухлини), зменшення частоти та інтенсивності гострих променевих ушкоджень, а використання об'ємно-модульованої променевої терапії арками дозволяє зменшити час проведення одного сеансу променевої терапії до 3-5 хвилин. Хіміопроменеве лікування в передопераційному періоді призводить до

збільшення сфінктерозберігаючих операцій без збільшення числа післяопераційних ускладнень, можливість отримати в ряді спостережень повну гістологічну відповідь [21].

Тактика лікування хворих з резектабельними пухлинами прямої кишки з критеріями T3-4 або будь-яке T і N1-2 з критерієм M0 (стадії T3-4N0-1-2M0) передбачає проведення передопераційної променевої терапії. Цей принцип, встановлений ще в 70-80-ті роки минулого століття, не змінився і в даний час. У країнах Євросоюзу використовується передопераційна (неoad'ювантна) інтенсивна променева терапія сумарною вогнищевою дозою 25 Гр. Європейські дослідники показали, що використання неoad'ювантної променевої терапії дозою 25 Гр зменшує кількість місцевих рецидивів з 27% до 12%. У США стандартом лікування місцево-поширеного РПК є післяопераційна променева терапія сумарною вогнищевою дозою 45 Гр в комбінації з хіміотерапією 5-фторурацилом. Рандомізовані дослідження показали, що застосування такої схеми, дозволяє зменшити кількість місцевих рецидивів РПК з 24% при використанні тільки хірургічного лікування, до 11%. В Україні найбільш поширеним методом неoad'ювантного впливу на пухлину при резектабельності РПК є інтенсивна дистанційна променева терапія сумарною вогнищевою дозою 25 Гр. Було показано, що даний режим, зменшує кількість місцевих рецидивів раку прямої кишки з 15,3% до 7,2% при відсутності метастатичного ураження лімфовузлів, і з 28,5% до 12,9% при метастатичному ураженні лімфовузлів [20-22].

1.2.3. Стандартне та індивідуалізоване медикаментозне лікування хворих на рак прямої кишки. У ряді випадків пухлина прямої кишки є нерезектабельною через фіксацію до стінок таза, крижів, інфільтрації пухлиною клубових судин. Єдиним методом лікування при цьому залишається високодозова променева терапія за розщепленою методикою. В останні роки підхід до лікування таких хворих дещо змінився: пріоритетним стало використання хіміо-променевої терапії. Найпоширенішими хіміопрепаратами

при цьому є 5-фторурацил, мітоміцин-С, кселода, препарати платини (цисплатин, карбоплатин, оксаліплатин). Хіміопрепарати, крім прямого впливу на пухлину, виконують роль радіомодифікаторів за рахунок синхронізації клітинного циклу пухлини, а також блокують процеси репарації в пошкоджених променевою терапією клітинах пухлини [18, 20]. Комбіноване лікування хворих з використанням інвазивних методик: неoad'ювантної ендолімфатичної або внутрішньоартеріальної хіміотерапії показали результати зіставні з використанням променевої терапії і не знайшли широкого застосування в комбінованому лікуванні РПК. Разом з тим, за наявності критерію T4 і метастатичному ураженні лімфовузлів при будь-якому T (N1-2), рекомендується проведення ад'ювантної (додаткової) хіміотерапії через 3-5 тижнів після операції (всього 6 курсів з інтервалом між ними 4-6 тижнів).

Останні роки ознаменувалися інтеграцією в клінічну практику таргетних агентів - бевацизумабу (Авастин), цетуксимабу (Ербітукс) і панітумумабу (Вектібікс). Наприклад Бевацизумаб являє собою моноклональні антитіла (МКАТ) до фактору росту ендотелію судин (VEGF) і блокує зв'язування ліганда з рецепторами (VEGFR) на клітинах ендотелію, надаючи в комбінації з хіміопрепаратами синергічний протипухлинний ефект. Іншим напрямком таргетної терапії злоякісних новоутворень є блокада рецепторів епідермального фактора росту (EGFR) [22-25]. У 60-80% випадків раку товстої кишки відзначена збільшена експресія EGFR, що асоційоване з несприятливим прогнозом подальшого перебігу хвороби. Однак, в більшості досліджень не відзначена суттєва кореляція між експресією EGFR і ефективністю хіміопроменевого лікування у хворих на РПК. При цьому відзначено, що низька експресія EGFR асоціюється із зниженням показника розміра пухлини після проведеного хіміопроменевого лікування [26-28].

Існує дві групи препаратів, що блокують EGFR-сигнальний шлях: цетуксимаб, панітумумаб, які зв'язуються з екстрацелюлярним доменом рецептора і займають місце ліганда, і малі молекули - інгібітори тирозинкінази

(гефітиніб, ерлотиніб), блокуючі процес фосфорилування в тирозинкіназних доменах [20]. Конкурентне інгібування EGFR цетуксимабом призводить до пригнічення проліферації, інвазії та метастазування з одночасною стимуляцією апоптозу і підвищенням чутливості клітини до хіміо-і променевої терапії [21, 26 - 29] та інгібіції надлишкової продукції VEGF пухлинними клітинами і, відповідно, неоангіогенезу [28, 29].

Наразі радіорезистентність пухлинних клітин автори пов'язують з мутацією в гені KRAS, що обумовлюють в тому числі високу ймовірність резистентності і до цетуксимабу. Мутації гена KRAS в 12-13-х кодонах визначаються приблизно в 40% випадків метастатичного раку товстої кишки [30-32], при цьому відсутність мутації достовірно корелює з ефективністю цетуксимабу в 1-й лінії лікування. В даний час у хворих метастатичним раком товстої кишки перед призначенням цетуксимабу рекомендується визначати статус KRAS.

Таким чином, відсутність загальноприйнятої методики оцінки експресії рецептора EGFR в пухлини у хворих на РПК ускладнює його оцінку як маркера, який пророкує відповідь на ХПТ. Також роль мутації KRAS залишається поки не визначеною. Проте результати численних досліджень свідчать, що введення інгібіторів EGFR в хіміопроменевому лікуванні хворих на РПК при дикому типі гена не призводить до підвищення частоти повних патоморфологічних регресій [32-35]. Ще одним перспективним напрямком в лікуванні хворих на РПК в клінічній онкології є застосування імуномодуляторів. Хоча їм не властива пряма протипухлинна дія, але їх використання доцільно на різних етапах лікування хворих з метою корекції порушених ланок імуного захисту, зменшення негативного впливу інших засобів медикаментозної терапії (хіміо- та променевої терапії) для підвищення якості життя, а також для профілактики ускладнень в до- та післяопераційний період. Одним із таких перспективних імуномодуляторів є препарати класу «Ербісол», що за клінічними даними дозволяють підвищити ефективність

лікування хворих на КРР. [36] В склад препаратів входить низько молекулярний комплекс органічних речовин негормональної природи із ембріональної тканини тварин. «Ербісол» діє на макрофаги та кілери, володіє імунокорегуючими властивостями, сприяє збільшенню продукції IL-1, IL-2, IL-12, фактора некроза пухлин- α , інтерферонів. При цьому є дані, що за умов застосування даного препарату у онкологічних хворих призводить до зниження високих рівнів IL-1 та фактора некрозу пухлтин- α . При цьому препарат даного класу - «Ербісол Ультрафарм» проявляє також властивості природнього цитостатика, що пригнічує аномальний ріст клітин та дозволяє не тільки застосовувати препарат в якості супроводу, але і замінити біотерапією деякі курси хіміотерапії. Також існують клінічні дані, що комплексне застосування фторпірімідинів із препаратами класу «Ербісол» в лікуванні хворих на колоректальний рак с метастазами в печінку збільшує число пацієнтів, у яких спостерігається стабілізація захворювання, статистично достовірно ($p < 0,05$) продовжує тривалість стабілізації захворювання та підвищує виживаність пацієнтів. Таким чином, стандартним лікуванням РПК, що виходить за межі її стінки, або метастазів в найближчі регіонарні лімфатичні вузли вважають радикальну резекцію з наступною ад'ювантною терапією опроміненням і хіміотерапією. При цьому для клініцистів складно передбачити ефекти лікувальної стратегії у окремо взятого пацієнта з наявністю лише даних середньої ефективності від лікування, що спостерігається в рандомізованих клінічних випробуваннях. З ростом розуміння пухлинної гетерогенності та, відповідно, індивідуальної чутливості, розробка індивідуалізованих моделей прогнозування для оцінки ефекту терапії є важливим кроком до персоналізованого лікування [37].

1.3. Клінічна значимість дослідження експресії в пухлинних клітинах молекулярних маркерів, як основа для індивідуалізованого медикаментозного лікування хворих на рак прямої кишки.

1.3.1. Дослідження експресії в пухлинних клітинах молекулярних маркерів медикаментозної резистентності.

Одним із шляхів вирішення проблеми підбору препаратів для ад'ювантної хіміотерапії хворих на рак, в тому числі і РПК, є пошук різних маркерів, що визначають прогноз захворювання та ефективність лікування. До них належить визначення: мікросателітної нестабільності в пухлині; рівня експресії тимідилат-синтетази; рівня експресії дигідропіримідин-дегідрогенази (DPD); рівня експресії тимідин-фосфорилази та широкоживаних маркерів медикаментозної резистентності: ABC транспортерів, глутатіон-S-трансферази та ін. [38-44].

Один з найбільш поширених типів резистентності до протипухлинних препаратів - так звана множинна лікарська резистентність (MDR), коли поява стійкості до одного з цитостатиків супроводжується резистентністю до інших ліків, що відрізняється за структурою і механізмом дії [45-47]. Основною причиною розвитку цього типу резистентності є експресія зворотного транспорту цитостатиків з пухлинних клітин, що призводить до зниження їх внутрішньоклітинного вмісту і як результат - до зменшення ефекту протипухлинної терапії. Процес здійснюється за участю транспортних білків, які функціонують за рахунок енергії АТФ: ABC-транспортери (ATP-binding cassette (ABC) transportes). До протипухлинних препаратів з перехресною резистентністю (MDR - препарати) відносяться антрацикліни, вінкаалкалоїди, і деякі інші, тобто більшість ефективних цитостатиків. У більшості пухлин множинна лікарська резистентність є індукованою, тобто експресія ABC-

транспортерів і втрата чутливості до хіміотерапії розвиваються під впливом ліків [48-50]. Що ж до пухлин товстої кишки, то їм властива вроджена множинна лікарська резистентність, яка не пов'язана із застосуванням протипухлинних препаратів, і виявляється вже в первинних пухлинах. Маркерами множинної лікарської резистентності є наступні ABC-транспортери: Pgp (Р-глікопротеїн), MRP (білок, асоційований з множинною лікарською резистентністю), LRP і BCRP (білки, асоційовані з резистентністю раку легені і раку молочної залози відповідно) і інші ще неідентифіковані транспортери [51-55].

Для виявлення активності різних транспортерів використовується інгібіторний аналіз: в одному і тому ж зразку пухлини порівнюється початкове внутрішньоклітинне накопичення доксорубіцина з цим же показником після дії на клітини специфічного інгібітору транспортера. Зокрема, оцінка активності кожного з вивчених ABC-транспортерів в нормальній і пухлинній тканинах проведена в трьох зразках одного і того ж матеріалу біопсії: вивчена функціональна активність Pgp (інгібітор - Верапаміл), MRP (інгібітор - геністеїн) і сумарна активність усіх ABC-транспортерів в цілому (інгібітор - азид натрію). Перший і дуже важливий факт, який вдалося показати, - в нормальній слизовій оболонці і злоякісних пухлинах товстої кишки виявляється функціональна активність ABC-транспортерів. Клітинна система зворотнього транспорту функціонує в 100% випадків раку товстої кишки і в 70% - в нормальній слизовій оболонці. У пухлинах товстої кишки експресія функціональної активності Pgp виявляється в половині випадків, тоді як MRP - в 2/3 досліджених пухлин. У нормальній слизовій оболонці товстої кишки частота експресії функціональної активності цих транспортерів приблизно однакова - близько 50%. Іншими словами, частота експресії функціональної активності Pgp в слизовій оболонці і пухлинній тканині приблизно однакова, тоді як функціональна активність MRP в раку товстої кишки виявляється частіше. Крім того, в досліджених зразках нормальної слизової оболонки і раку

товстої кишки виявлена експресія ABC-транспортів, відмінних від Pgp і MRP. При цьому в переважній більшості пухлин товстої кишки визначається функціональна активність декількох ABC-транспортів: Pgp і MRP, Pgp і/або MRP і інших ABC-транспортів, відмінних від Pgp і MRP [56 -60]. Отримані дані свідчать про те, що фенотип множинної лікарської резистентності раку товстої кишки людини в переважній більшості випадків визначається функціонуванням більш ніж одного транспортного білку. При цьому спектр поєднань експресії функціональної активності різних ABC-транспортів, в різних пухлинах товстої кишки різний.

Сучасна хіміотерапія раку товстої кишки розвивається в обхід механізму множинної лікарської резистентності: зокрема, модифікуються препарати платини, удосконалюється хіміотерапія з використанням антиметаболітів. При цьому велика група ефективних протипухлинних MDR- препаратів, таких як антрацикліни, подофілотоксини, вінкаалкалоїди і таксани практично повністю виключаються з арсеналу лікувальних засобів раку товстої кишки [61, 62]. Нам це здається стратегічною помилкою, оскільки можливість реалізації їх специфічної активності на тлі інгібування ABC-транспортів представляється цілком реальною.

Порівняльна оцінка функціональної активності ABC-транспортів в нормальній слизовій оболонці і пухлинах товстої кишки виявила ряд цікавих фактів, які дозволяють висловити припущення про "походження" природної множинної лікарської резистентності пухлин товстої кишки. Найбільш поширеним є уявлення про те, що експресія ABC-транспортів, визначена в нормальній слизовій оболонці товстої кишки, де вони здійснюють захист клітин від потрапляння в них токсичних речовин, зберігається в процесі малігнізації [63 - 66].

Альтернативним механізмом виникнення лікарської стійкості до протипухлинної терапії є гіперекспресія членів сімейства глутатіонтрансферази - GST [67-70], які сприяють зв'язуванню глутатіону з різними ксенобіотиками

та обумовлюють при цьому їх детоксикацію. Глутатіонтрансфераза, за даними дослідників, частіше експресується в пухлинах недрібноклітинного раку легенів і є незамінним маркером резистентності останніх до цисплатину; що стосується відомостей про експресії GST в клітинах РПК, то такі публікації дуже нечисленні і свідчать про зв'язок даного ферменту з генетичним поліморфізмом і виживанням пацієнтів; питання ж про те, наскільки представники сімейства глутатіонтрансферази можуть бути використані в якості маркерів стійкості пухлин РПК до цитостатиків, залишається відкритим, оскільки до кінця не встановлений сам факт експресії цього тіолу в клітинах пухлин кишечника. Інший маркер з цієї ж групи - металлотіонеїн (MT), також бере участь у захисті клітини від токсичних факторів, включаючи цитостатики. Клітини, що експресують MT, часто стійкі до цисплатину, адриаміцину, блеоміцину і ін. [71-74]. Є відомості щодо експресії MT в пухлинних клітинах стравоходу, проте чи спостерігається його експресія в клітинах кишечника, поки не встановлено. Говорячи про системи детоксикації в пухлинних клітинах, не можна не згадати фермент тимідилатсинтетазу (ТС), що є мішенню для 5-FU, а також для фторпіримідинів, які широко використовуються при лікуванні пухлин шлунково-кишкового тракту. Клінічний досвід при раку шлунка 3-4 стадії продемонстрував, що лікування високими дозами 5-FU і лейковорина дає ефект тільки при низького ступеня експресії ТС в тканині пухлини: число хворих, що відповіли на терапію, досягало 96% проти 12% у тих хворих, пухлини яких відрізнялися високою експресією ТС [75, 76]. Ген BRCA1, будучи активним учасником репарації ДНК, найбільш досліджений при раку легені, яєчників і молочної залози [77-79]. За деякими даними мутації генів BRCA1 і BRCA2 підвищують також ризик виникнення раку шлунка, товстої кишки, ендометрію, підшлункової залози, сечового міхура, пухлин голови та шиї, жовчовивідних шляхів, а також виникнення меланоми. На сучасному етапі недостатньо інформації для об'єктивної оцінки ролі даного маркера у визначенні лікарської резистентності для колоректальних пухлин [80-84].

Таким чином навіть короткий перелік біологічно активних молекул, що асоційовані з медикаментозною стійкістю пухлинних клітин до цитостатиків, свідчить про різноманіття механізмів, що лежать в основі згаданого феномена.

Відомо, що цитотоксична дія переважної більшості протипухлинних препаратів реалізується шляхом індукції апоптозу - програмованої клітинної смерті. Сьогодні встановлено, що вирішальну роль в цьому процесі відіграє функціональна активність білкових продуктів генів p53 і Bcl-2 [87-89]. p53 - білок, який регулює проходження клітини по клітинному циклу. Активність p53 потрібна для інтенсифікації деяких форм апоптозу і його мутації можуть бути асоційовані з агресивністю перебігу захворювання і резистентністю пухлинних клітин до хіміо- і променевої терапії. Мутації гена p53 - одне з найпоширеніших порушень, яке знаходять у всіх етипах пухлин людини [90, 91]. У літературі ряд авторів наводять значний відсоток встановлених мутацій в клітинах колоректального раку: за деякими оцінками в 40-50% випадків пухлин, з яких переважна більшість локалізована в 17 тій хромосомі і асоційована з можливим успадкуванням доброякісного поліпозу, який, в свою чергу, розглядається як передраковий стан і потребує постійного спостереження [92-95].

Наразі існують дані щодо взаємозв'язку чутливості РПК та пухлинного супресора p21, що є інгібітором / регулятором клітинного циклу. Автори найчастіше пов'язують даний білок із променевою терапією РПК, але існуючі клінічні дані поодинокі і досить суперечливі. [96-101]. Білками, що також беруть участь в регуляції апоптозу, є продукти протоонкогена Bcl-2. Вчені припускають, що гени цієї родини грають суттєву роль в хіміорезистентності пухлин до цитостатиків саме завдяки зниженню апоптозу в пухлинних клітинах, хоча певні представники цього сімейства, навпаки, індукують апоптоз. Більш детальний розгляд цього феномена не є предметом обговорення в рамках даного огляду; залишається тільки зробити висновок, що співвідношення про- і антиапоптотического дії членів даного сімейства білків і визначить, чи піддасться клітина апоптозу в результаті впливу ушкоджую

агентів (цитостатиків). У літературі, однак, відображені окремі позитивні результати роботи з клітинними культур колоректального раку, на яких наочно показано протекторну дію активації рецепторів регуляції протоонкогена Bcl-2 в умовах дії на клітину адриаміцина. Як і білок Bcl-2, bax - білок регулює процес апоптозу, втрачаючи який клітини раку товстої кишки стають хіміорезистентними, в тому числі і до 5-фторурацилу [102- 106].

1.3.2. Роль топоізомерази II альфа та ERCC1 в індивідуалізації медикаментозного лікування хворих на РПК

Ключовими регуляторами для основних препаратів при лікуванні хворих на РПК оксалиплатином і іринотеканом є топоізомерази I і топоізомерази II. ДНК-топоізомерази I є мономерними білками, що релаксують ДНК без витрати енергії шляхом внесення одноланцюгових розривів. ДНК-топоізомерази II функціонують у вигляді димерів, здійснюючи АТР-залежне розщеплення обох ланцюгів ДНК з подальшим перенесенням ланцюгів через розрив і його лігуванням. В результаті ферменти виявляються ковалентно зв'язаними з 5'-або 3'-кінцями ДНК в одноланцюговому розриві, утворення такого ковалентного зв'язку виключає необхідність витрати енергії при відновленні фосфодієфірного зв'язку в одноланцюговому розриві на заключних стадіях реакції [107, 108].

Топоізомераза I була відкрита в 1969 році. У ході своєї роботи топоізомерази типу I вносять розрив лише в одну з ланцюгів подвійної спіралі. і не вимагають ніяких кофакторів: вносячи розрив в одну з ланцюгів подвійної спіралі, фермент ковалентно пришивається до одного з кінців ланцюга, запасуючи енергію необхідну для подальшого з'єднання цього ланцюга. [109 - 112]. У клітинах людини ДНК-топоізомераза IB / III специфічно інгібується камптотецином (camptothecin). Це з'єднання взаємодіє переважно з ковалентним комплексом топоізомераза I-ДНК, що пригнічує реакцію відновлення фосфодієфірного зв'язку та звільнення ферменту з комплексу, в

результаті відбувається швидке накопичення дволанцюгових розривів ДНК і перехід клітин в апоптоз.

ДНК-топоімераза II локалізована в ядрі та у великих кількостях асоціюється з ДНК як в інтерфазних, так і метафазних ядрах. При цьому ДНК-топоімераза II є одним з ключових ферментів необхідних для вирішення топологічних проблем, що виникають при зміні структури хроматину в процесах реплікації ДНК, транскрипції генів і сегрегації хромосом в мітозі і мейозі. Підвищена експресія ферментів репарації ДНК дозволяє пухлині нейтралізувати вплив терапевтичних засобів. Позитивний результат при призначенні антрациклінів більш ймовірний, коли в пухлині активована мішень препаратів цієї групи - топоімераза II-альфа. [113-115].

Важливим факторами, що беруть участь у формуванні медикаментозної стійкості пухлин, є ферменти репарації ДНК при пошкодженні її цитостатиками. Серед таких ферментів слід, перш за все, згадати такі ферменти як ERCC1, ERCC2, XRCC1 і їх аналоги [116-118]; щодо цих маркерів чітко доведено взаємозв'язок між низьким рівнем їх експресії і відповіддю пухлини на цитостатик, карбоплатин або оксаліплатин при злоякісних пухлинах яєчників, стравоходу, шлунка і товстої кишки. Встановлено, зокрема, що втрата активності гена XRCC1 в результаті мутації супроводжується зниженням інтенсивності репараційних процесів в ДНК і, як наслідок, - реалізацією протипухлинного ефекту оксіплатіна і інших цитостатиків. Armando Orlandi, Mariantonietta Di Salvatore і співавтори, експериментально показали чутливість клітинної лінії оло ректальних раку з мутацією репараційного гена ERCC1 в умовах впливу оксаліплатина. Вивчення групи репараційних можливостей пухлинних клітин – одна з перспективних завдань сучасної онкології в питанні встановлення причин пухлинної резистентності і фермент ERCC1 є одним з перспективних для колоректальних пухлин [119-122].

1.3.3. Маркери стовбурових пухлинних клітин та їх роль в розвитку РПК

Сьогодні існує велика кількість даних щодо зв'язку стовбурових пухлинних клітин [123-125] та злоякісності і медикаментозної резистентності злоякісно трансформованих клітин CD133 є одним із найвідоміших маркерів стовбурових клітин раку товстої кишки, при цьому є свідчення, що CD133-позитивні пухлинні клітини резистентні до ХПТ [126-128]. Експресія CD133 при коло ректальному раку найчастіше зустрічається саме при РПК, ніж при раку ободової кишки. Зокрема, у комплексному дослідженні Н. Yasuda et al., одночасно оцінювалася експресія EGFR, VEGF та CD133: у зразках пухлини до ХПТ відзначена позитивна кореляція між експресією CD133 і EGFR ($r = 0,774$); кореляція між CD133 і VEGF, а також VEGF і EGFR була меншою ($r = 0,378$ і $0,39$). У зразках пухлини після ХПТ кореляція спостерігалась в групі з високою експресією CD133 в пухлинних клітинах, але не VEGF або EGFR. При цьому тривалість життя була коротшою в групі хворих з високими значеннями експресії CD133 в пухлині. Жоден з клінікопатоморфологічних параметрів, а також прогресування хвороби не були пов'язані з високою експресією CD133 ($> 40\%$ клітин) ні в матеріалі до лікування, ні в резидуальній пухлині. Проте в групі пацієнтів, у яких відмічено збільшення експресії CD133, в процесі терапії частіше розвивалася прогресія захворювання, а виживаність була нижче незалежно від характеру хіміотерапевтичного компонента (з оксаліплатином або без). Однак проявилася зворотня кореляція між активністю експресії CD133 і фактора гіпоксії HIF-2 α в пухлині після завершення ХПТ [126-130]. Однак S.V. Shmelkov et al. показали, що для виділення стовбурових пухлинних клітин недостатньо орієнтуватися тільки на експресію CD133. Виявилося, що тільки 1 з 262 клітин аденокарциноми прямої кишки, що експресують CD133, має здатність до росту пухлини.

Іншими маркерами стовбурових пухлинних клітин є OCT4 і SOX2. Це білки представляють собою транскрипційні фактори, збільшення експресії генів яких призводить до формування в клітинах фенотипу подібного до ембріональних стовбурових клітин. За оцінкою експресії генів CD133, OCT4 і SOX2 в пухлині прямої кишки до та після ХПТ визначено, що ХПТ призводила до посилення експресії CD133, але зниження OCT4 і SOX2. При цьому експресія цих 3 генів була асоційована з патоморфологічною відповіддю.

Одним з маркерів, що також відносять до характеристики стовбурових властивостей клітини, є CD44. CD44 – глікопротеїн, що залучений в процеси клітинної адгезії та сприяє метастазуванню пухлини [131-133]. CD44 опосередковує зчеплення клітин з позаклітинним матриксом та бере участь у багатьох клітинних процесах, в тому числі рості, диференціюванні і рухливості. В епітелії товстої кишки CD44 експресується переважно в глибині крипт та є дані щодо інгібіції апоптоза і асоціації з агресивною поведінкою пухлини, пухлинною прогресією і стадією Dukes. Наразі запропоновано використовувати маркер стовбурових пухлинних клітин трансмембранний глікопротеїн CD44, який проявляє свою активність в процесі росту, виживання, диференціювання і рухливості клітин.

Аналізуючи експресію CD133 і CD44 виявлено, що найчастіше маркери виявляються в різних клітинах пухлини та їх експресія не часте явище. Все ж клітини, які експресують CD44, мають високу туморогенну активність. Так, у хворих на РПК після хірургічного лікування експресія CD133 та CD44 не була асоційована з розвитком подальшого рецидива, але на виживаність впливала експресія CD133, а не CD44. В роботі показано що після завершення ХПТ місцево-поширеного РПК експресія CD133 пов'язана з низькою виживання пацієнтів, в той же час рівень експресії CD44 не впливав на віддалені результати лікування [134, 135].

Сигнальний шлях LGR5-Wnt- β -catenin-TCF4 є одним з важливих в канцерогенезі раку товстої кишки. LGR5 є представником глікопротеїнових

гормональних рецепторів, які є мішенню в сигнальному шляху Wnt, до того ж він розглядається як маркер стовбурових клітин епітелію товстої кишки. Зокрема проводився аналіз експресії LRG5 і CD44 пухлин 52 хворих на РПК, які отримували передопераційну ХПТ: показано, що експресія LGR5 чітко асоційована з високою диференціацією резидуальних пухлин, а високий рівень мРНК LGR5 був асоційований з низьким рівнем лікувального патоморфозу та коротким часом виживання хворих. Так мРНК CD44 була виявлена в 30,8% резидуальних пухлин, експресія білка CD44 в пухлинних клітинах була асоційована з результатами лікування, а експресія CD44 в стромі пухлини асоціювалась з низьким ступенем лікувального патоморфозу і розвитком рецидиву хвороби. Показано негативне прогностичне значення експресії CD44 в стромі пухлини та наявність позитивної кореляції між експресією мРНК LGR5 і мРНК LKB1 в пухлині прямої кишки після завершення ХПТ. Гіперекспресія цих двох генів була пов'язана з меншою частотою патоморфологічних ефектів [136].

1.3.4. Білки адгезії та клітинного цитоскелету в прогресії РПК.

Маркери епітеліально-мезенхімального переходу злоякісно-трансформованих клітин РПК.

Більшість робіт, що присвячені вивченню ролі молекулярних маркерів при КРК та РПК, зосереджено на чинниках проліферації і апоптоза: Ki67, p53, bcl-2, bax, оскільки останні обумовлюють пухлинну прогресію і впливають на злоякісний фенотип клітин. При цьому не менш важливими показниками пухлинного росту є маркери, що безпосередньо впливають на набуття пухлинними клітинами інвазивної здатності та формування метастатичного фенотипу, зокрема молекули міжклітинної адгезії: кадгерини, катенін, CD44, MMP, компоненти система активації плазміногену та ін. Особливу значущість в оцінці інвазивних / мігровційних властивостей злоякісно трансформованих

клітин має визначення рівня експресії таких молекул, як Е-кадгерин, β -катенін і CD 44, роль яких у розвитку метастазів РПК вивчена недостатньо.

Зменшення клітинної адгезії є одним із механізмів, що лежить в основі інвазії та прогресування раку, саме тому одним з потенційних білкових маркерів перебігу пухлинного процесу є молекула адгезії Е-кадгерин, що належить до родини кадгеринів і є Са-залежним трансмембранним глікопротеїном. Існує чотири підкласи: Е-, Р-, N- та R- кадгерини. [138]

Молекула Е-кадгерину складається з цитоплазматичного, трансмембранного та позаклітинного домену, при цьому цитоплазматичний домен взаємодіє з молекулами катеніну, включаючи β -катенін або плакоглобін для його зв'язування з актином цитоскелету. β -катенін, в свою чергу, може зв'язуватися з цитоплазматичним доменом рецептора епідермального фактора росту (EGFR). Зниження експресії Е-кадгерину асоційовано з певними ознаками злоякісності, зокрема прогресування захворювання, втрату диференціювання, інвазію та метастазування. При розвитку пухлинного процесу відбувається інгібіція / інактивація Е-кадгерину шляхом мутації, епігенетичних механізмів, посилення ендоцитозу та протеолізу. Тоді як підвищення експресії супресорів Е-кадгерину, зокрема транскрипційного фактору SNAIL, асоційовано з прогресією багатьох типів раку [138]. Аномальна активація протоонкогенів, включаючи Src та EGFR, призводить до збільшення фосфорилування залишків тирозину в цитоплазматичному домені Е-кадгерину і згодом відбувається його убіквітін-залежна деградація [139].

За даними авторів показано, що поява метастазів при прогресії колоректального раку пов'язана зі зменшенням експресії α -катеніну та / або зі зменшенням експресії α -катеніну та Е-кадгерину, а не лише з експресією Е-кадгерину. В іншому дослідженні, проведеному з 36 хворими на колоректальний рак, було показано, що Е-кадгерин є потенційним маркером, але не має необхідної специфіки для прогнозування прогресування пухлини; концентрація Е-кадгерину була вищою для пацієнтів з КРК порівнянно із

пацієнтами з доброякісними пухлинами [140]. Тоді як Weiss et al. (2011) в порівняльному аналізі рівня розчинного Е-кадгерину у 59 пацієнтів із КРК та у пацієнтів з іншими станами, включаючи колоректальні аденоми, запальні захворювання кишечника або родинний аденоматозний поліпоз показали значне підвищення рівня розчинного Е-кадгерину у пацієнтів із запущеними КРК (III та IV стадії) та запропонували потенційне застосування розчинного Е-кадгерину як діагностичного маркера для моніторингу захворювання. Також дослідниками встановлено, що передопераційний підвищений рівень розчинного Е-кадгерину пов'язаний з гіршим прогнозом та є дотерапевтичним прогностичним маркером для пацієнтів із КРК та печінковими метастазами [141].

Е-кадгерин відіграє вирішальну роль у адгезії клітин та підтримці епітеліальної морфології: втрата Е-кадгерину призводить до набуття клітинами рухомого та інвазивного фенотипу. Дослідження, що включали хворих на колоректальний рак, показало, що пацієнти із зменшенням або відсутністю експресії Е-кадгерину в пухлині характеризувались коротшою тривалістю життя; втрата експресії Е-кадгерину була важливим і незалежним предиктором щодо поганого прогнозу. Крім того, виявлено і роль Е-кадгерину в прогресуванні колоректального раку: експресія Е-кадгерину у 108 пацієнтів з метастазами була нижчою, ніж у умовно нормальних сусідніх тканинах і була пов'язана з диференціацією пухлини, глибиною інвазії, метастатичним ураженням лімфатичних вузлів та, відповідно, стадії пухлини [142, 143]. Як наслідок такої асоціації, Е-кадгерин стає сьогодні потенційною мішенню для протипухлинного лікування, а шляхом регулювання експресії Е-кадгерину ризик прогресії КРК може бути зменшений. Надзвичайно цікаві дані щодо підвищення експресії Е-кадгерину у пацієнтів, які отримували кальцій та вітамін D, що сприяє хіміопрофілактиці виникнення рецидиву КРК [144].

Існують дані щодо зв'язку сигнального шляху Wnt з прогресуванням КРК та, відповідно, РПК. Wnt білки зв'язуються з Frizzled (Fz) трансмембранними

рецепторами, які активують внутрішньоклітинний сигнальний каскад та впливають на різні клітинні функції включаючи їх рухливість та проліферацію [145]. Існує три шляхи Wnt: шлях β -катеніну, залежний від кальцію та шлях полярності клітин. Шлях β -катеніну сприяє росту та розмноженню клітин, тоді як 2 інші регулюють рухливість клітин та полярність. За відсутності лігандів Wnt вільний внутрішньоцитоплазматичний β -катенін фосфорилується білковим комплексом і деградує в протеасомі, завдяки чому внутрішньоцитоплазматичний рівень β -катеніну дуже низький. Однак зв'язування ліганду Wnt дозволяє уникнути деградації β -катеніну протеасомою, стабілізується і потрапляє в ядро. Там ядерний β -катенін разом з фактором Т-клітин (TCF / LEF) активує експресію генів, відповідальних за регуляцію клітинного циклу та проліферацію клітин, таких як циклін D1 (CCND1), матрична металопротеїназа 7 (MMP7), c-MYC і сурвівін (BIRC5) [146].

β -катенін - це багатофункціональний білок, який відіграє ключову роль у сигнальному шляху Wnt / β -катеніну та у адгезії клітин в комплексі з E-кадгерином. Порушення такого комплексу впливає на інвазію пухлини та призводить до епітеліально-мезенхімального переходу (ЕМП), активації метастазування і, відповідно, прогресуванню пухлинного процесу, в тому числі і при РПК [147, 148].

β -катенін є молекулою, функція якої визначається її внутрішньоклітинною локалізацією, зокрема катенін, пов'язаний з мембранною клітини, бере участь в процесах міжклітинної взаємодії та адгезії, тоді як цитоплазматична фракція бере участь в процесах трансдукції сигналу по WNT шляху, беручи участь в процесах ембріогенезу, підтримці функції стовбурових клітин і злоякісної трансформації. β -катенін проходить в ядро клітини, де з коактиваторами TCF7 і TCF7L2 регулює експресію відповідних генів мішеней, в тому числі і гена c-Myc, що, в свою чергу, пригнічує експресію інгібітора клітинного циклу p21 [149].

Всі описані вище білки є також маркерами процесу епітеліально-мезенхімального переходу (ЕМП), наявність якого при пухлинній прогресії призводить до надбання клітинами доброякісних пухлин здатності до інвазії і міграції, що, в свою чергу, призводить до активації метастазування пухлин і розвитку злоякісного процесу. Епітеліальні клітини утворюють міцні міжклітинні контакти та формують щільний моношар, який виключає відокремлення індивідуальних клітин, тоді як мезенхімальні клітини не формують впорядкованої структури та не утворюють щільних міжклітинних контактів, завдяки чому зменшуються їх адгезивні властивості та збільшується їх здатність до міграції. Відомо, що як епітеліальні, так і мезенхімальні клітини внаслідок дії певних чинників можуть набувати властивостей клітин обох типів. Стандартні зміни, що відбуваються при ЕМП, включають підвищення експресії N-кадгерину і віментину, ядерну локалізацію β -катеніну і підвищену експресію таких транскрипційних факторів, як Snail, Slug, ZEB1, ZEB2, Twist, які пригнічують експресію E-кадгерину, що, в свою чергу, викликає підвищену здатність клітин до дисемінації, а також асоціюється з їх резистентністю до апоптозу[150-152]. Ідентифікація ЕМП при прогресії захворювання, в тому числі і при РПК, в організмі людини залишається однією з центральних проблем, оскільки ЕМП стає мішенню для розробки протипухлинних препаратів. Крім того, є дані, що пухлинні клітини, які характеризуються властивостями стовбурових пухлинних клітин також зазнають процесу ЕМП, а клітини з СПК фенотипом є резистентними до хіміопрепаратів.

Таким чином СПК та ЕМП є ключовими рушіями метастазування і прогресування пухлинного захворювання, в тому числі РПК, і, відповідно, їх сурогатні маркери мають прогностичне значення. Пухлинні клітини РПК при набутті мезенхімального фенотипу (шляхом ЕМП) відриваються від первинної ділянки і інвазують в судини, що знаходяться поблизу і потрапляють до «класичних» органів-мішеней, такі як печінка та легені.

Чи всі клітини інвазивної пухлини товстої кишки з віддаленими метастазами мають фенотип ЕМП? Для відповіді на це питання необхідно розуміння будови слизової оболонки товстої кишки на клітинному рівні. Остання складається з певних структурних одиниць - крипт, які представлені різними типами клітин: ентероцити, бокаловидні клітини і ін.. У дослідженні Sadanandam A. і співавт. показано, що з крипти може розвинути 6 підтипів пухлин з різним прогнозом [153]. При цьому найбільш несприятливий прогноз мають пухлини, що розвиваються з клітин, які розташовані на мінімальній відстані від підслизового шару і характеризуються високим рівнем експресії генів SFRP2 і ZEB1, а також відрізняються високою активністю Wnt-шляху і високою експресією маркерів, характерних для мезенхімальних клітин [154].

ЕМП складний процес, пов'язаний зі зміною функціонування генів і їх регуляцією, а одним із регуляторів генів виступає мікроРНК: в одних випадках низька експресія мікроРНК призводить до активації ЕМП, в інших навпаки. Наприклад, низька експресія мікроРНК родини mir200, що включає мікроРНК 200a, мікроРНК 200b, мікроРНК 200c, мікроРНК 141 і мікроРНК 429, призводить до збільшення експресії генів ZEB1 / ZEB2, тим самим викликаючи активацію процесу ЕМП. Тоді як висока експресія мікроРНК 23a зменшує експресію гена-супресора пухлини CDH1 і активує Wnt / β -catenin сигнальний шлях [155].

Існують дані, що одним із інгібіторів ЕМП пухлинних клітин є ІФН-альфа 2b, що пригнічує їх злоякісність і метастатичну активність, в тому числі і клітин раку кишечника людини [156-158].

При цьому дослідниками показано, що режим метрономної низькодозової терапії хіміопрепаратами у поєднанні з ІФН, у пацієнтів з інкурабельним метастатичним РПК викликає в багатьох випадках регресію метастазів у печінці і значно підвищує 3-річну виживаність хворих [159]. Одним з механізмів протипухлинного ефекту низьких доз хіміопрепаратів, особливо у поєднанні з ІФН, було значне зниження рівня VEGF у крові пацієнтів, при

цьому питання щодо дії безпосередньо на ПК не ставилося, хоча продукція VEGF (часто самими ПК) обов'язково пов'язана з іншими клітинними змінами і часто є їх наслідком. У зв'язку з цим було досліджено проліферативні і фенотипові зміни клітин раку кишечника *in vitro* в умовах дії ІФН і низьких доз хіміопрепаратів. На моделі клітин ліній COLO-205 і HT-29, а також клітин метастатичного РПК людини на ранніх пасажах було показано, що тривала дія вищевказаних препаратів у субтоксичних концентраціях пригнічує прояви мезенхімального фенотипу клітин (зменшення кількості клітин з експресією мезенхімального транскрипційного фактору, з експресією CD44 та збільшення числа клітин з експресією Е-кадгерину) та інгібує клітинну проліферацію. Отримані факти свідчать про фенотипові зміни в клітинах раку кишечника людини, що призводять до реверсії ознак ЕМП у метастатичних клітинах із втратою їхньої злоякісності [160, 161].

Таким чином наведені дані свідчать про те, що загибель пухлинної клітини під дією цитостатиків контролюється певними регуляторними системами клітин, і що інформація про функціональний стан цих систем може бути корисною з точки зору передбачення результативності дії того чи іншого цитостатика. Говорячи про маркери лікарської стійкості пухлин кишечника, то тут слід зауважити, що найбільший інтерес з даної точки зору представляють топоізомераза II-альфа, ERCC1; створюється враження, що виявлення експресії цих маркерів в пухлинних клітинах дозволить передбачити ефективність тих чи інших схем лікарської терапії у відповідній категорії хворих при цьому надзвичайно цікавим є дослідження асоційованого зв'язку маркерів резистентності пухлинних клітин з маркерами ЕМП [162-164].

В даний час тривають пошуки ефективних біологічних маркерів передопераційної ХПТ при раку прямої кишки. Однак поява робіт з негативними даними показує, що пухлини суттєво відрізняються одна від одної і необхідно враховувати експресію комплексу маркерів для правильної оцінки чутливості пухлин до лікування. У данній роботі ми воліли виділити ряд

критеріїв індивідуального вибору схеми хіміотерапевтичного лікування за принципом виключення з причини малої ефективності. Предметом вивчення виступила схема FOLFOX, як основна для лікування хворих на РПК. А точніше пошук індивідуальних маркерів оцінки ефективності застосування платиновмісних схем на період до початку лікування. У варіанті, при якому знайдені маркери дозволяють розраховувати на позитивну відповідь від проведення схеми FOLFOX, вона проводиться, але за умови очікування низької ефективності від лікування за цією схемою - застосовується FOLFIRI. За таким підходом можна виявити наскільки виправданий такий підбір схем хіміотерапії у хворих на РПК та оцінити відсоток рецидивів у дослідній групі [165-171].

РЕЗЮМЕ

Хоча сьогодні і спостерігається стрімке збільшення числа хіміопрепаратів та їх включення в схеми лікування хворих на РПК медіана виживання хворих складає близько 18 - 24 міс, що залишається провідним показником якості їх лікування. При цьому вибір медикаментозного лікування хворих на РПК ґрунтується на клінічних рекомендаціях, основним недоліком яких є неврахування індивідуальних особливостей організму і пухлини, що супроводжується зниженням очікуваної ефективності та збільшенням токсичності. Стандартним лікуванням РПК, що виходить за межі її стінки, або метастазів в найближчі регіонарні лімфатичні вузли вважають радикальну резекцію з наступною ад'ювантною терапією опроміненням і хіміотерапією. При цьому для клініцистів складно передбачити ефекти лікувальної стратегії у окремо взятого пацієнта з наявністю лише даних середньої ефективності від лікування, що спостерігається в рандомізованих клінічних випробуваннях. З ростом розуміння пухлинної гетерогенності та, відповідно, індивідуальної чутливості, розробка індивідуалізованих моделей прогнозування для оцінки ефекту терапії є важливим кроком до персоналізованого лікування. Існує

велика кількість потенційних маркерів перебігу пухлинного процесу при РПК: антигени проліферації, маркери пухлинної супресії, синтезу і пошкодження ДНК, фактори росту і їх рецептори, білки, що асоційовані з інвазією, міграцією та метастазуванням злоякісно трансформованих клітин, але лишаються питання про найбільш інформативні маркери та їх кореляції із ефективністю лікування хворих, що, в свою чергу, дозволить зменшити побічні (токсичні) прояви протипухлинної терапії.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Клініко-морфологічна характеристика хворих

У клінічні групи увійшли 135 пацієнтів хворих на рак прямої кишки (РПК), які проходили лікування в Краматорському онкологічному диспансері протягом 2009-2018 років. Для діагностики та лікування даної групи пацієнтів використовувалися клінічні, гістологічні, імуногістохімічні, цитологічні, лабораторні, рентгенологічні, ультразвукові методи дослідження.

Всі хворі були проінформовані про дослідження і надали згоду на використання в дослідницьких цілях клінічних даних та гістологічного матеріалу. Дослідницька програма була схвалена комісіями з біоетики Рівненського обласного та Краматорського онкологічних диспансерів.

Визначення стадії пухлинного захворювання і його поширеність проводили за міжнародною системою TNM (в 7-виданні). У дослідну групу були включені хворі на РПК зі стадією перебігу хвороби $T_{1-4}N_{0-2}M_0$ в кількості 135 осіб. Верифікація діагнозу проводилася шляхом проведення біопсії пухлини прямої кишки до початку лікування, а також гістологічного дослідження післяопераційного матеріалу.

Стадію захворювання та характер поширення пухлинного процесу оцінювали шляхом проведення КТ органів грудної клітки, органів черевної порожнини, органів малого тазу до початку лікування, магніто-резистентної томографії органів малого тазу, ультразвукового дослідження органів черевної порожнини, а також трансректальні дослідження структури прямої кишки. Клінічну ефективність передопераційної променевої терапії оцінювали за допомогою проведення КТ органів черевної порожнини та органів малого тазу, а також МРТ органів малого тазу перед початком хірургічного лікування. Клінічний перебіг захворювання після радикального лікування передбачав

проведення УЗД органів черевної порожнини та малого тазу не рідше ніж 1 раз в 90 діб, КТ органів малого тазу 1 раз в 6 місяців.

Середній вік пацієнтів склав 56 ± 24 року (від 32 до 80 років). Серед хворих була 61 жінка (45%) і 74 чоловіків (55%).

Розподіл хворих проводили із врахуванням стадії захворювання (TNM-7, 2009 р.), характеристиками експресії біометричних маркерів в гістологічному матеріалі і характеру перебігу захворювання.

Інформація про всіх хворих: стадія захворювання, локалізація пухлини, гістологічна структура пухлини, ступінь диференціювання, схеми лікування кожного пацієнта, а також інформація про експресію білків представлені в табл. 2.1.

Таблиця 2.1

Клініко-морфологічна характеристика хворих на РПК

Характеристика хворих		Кількість хворих
Стать	чоловіки	74 (55%)
	жінки	61 (45%)
<i>Вік (роки):</i>		
<30		0 (0%)
31-40		12 (8%)
41-50		41 (31%)
51-60		49 (36%)
61-70		29 (22%)
>71		4 (3%)
<i>Локалізація пухлинного процесу в прямій кишці:</i>		
Верхньоампулярний		73 (54,1%)
Середньоампулярний		27 (20,0%)
Нижньоампулярний		35 (25,9%)

<i>Стадія захворювання:</i>		
I	T ₂ N ₀ M ₀	5 (3,7%)
II-A	T ₃ N ₀ M ₀	68 (50,4%)
II-B	T ₄ N ₀ M ₀	9 (6,7%)
III-A	T ₁ N ₁ M ₀	8 (5,9%)
	T ₂ N ₁ M ₀	17 (12,6%)
	T ₂ N ₂ M ₀	6 (4,4%)
III-B	T ₃ N ₁ M ₀	17 (12,6%)
	T ₃ N ₂ M ₀	5 (3,7%)
	T ₄ N ₁ M ₀	0 (0,0%)
	T ₄ N ₂ M ₀	0 (0,0%)
<i>Гістологічна структура пухлини:</i>		
Високодиференційована аденокарцинома		47 (34,8%)
Середньодиференційована аденокарцинома		59 (43,7%)
Низькодиференційована аденокарцинома		29 (21,5%)

За локалізацією пухлинного процесу (рис. 2.1) в прямій кишці мали місце: верхньоампулярний відділ – 73 випадки(54,1%), середньоампулярний – 27(20%) випадків, нижньоампулярний – 35(35,9%) випадків.

Гістологічне дослідження проводилось шляхом взяття біопсійного матеріалу під час ендоскопічного обстеження прямої кишки на етапі діагностики захворювання, а також дослідження пухлини після проведеної радикальної хірургічної операції.

Гістологічно всі пухлини були верифіковані як аденокарциноми (34,8% низько диференційований рак, 43,7% помірно диференційований, 21,5% - високо диференційований).

2.2. Характер променевого та хірургічного втручання

Всі хворі проходили лікування у відповідності до існуючих стандартів, затверджених наказом МОЗ України за № 554 від 17.09.2007 р.

За варіантом первинного лікування у 89 (65,9%) пацієнтів був проведений передопераційний дрібно фракційний курс телегаматерапії (СВД 40-50 Грей). Клінічна відповідь оцінювалась не раніше ніж через 30 діб по завершенню променевої терапії. Оперативне лікування проводилось у середньому через 30-60 діб після закінчення променевої терапії.

З метою оцінки регресії пухлинного процесу застосовували контрольну комп'ютерну томографію органів черевної порожнини та органів малого тазу, а також МРТ органів малого тазу.

Характер хірургічного лікування залежав від локалізації пухлинного процесу, а також ступеня регресії на проведену променеву терапію. За об'ємом оперативних втручань були проведені: через черевна резекція прямої кишки – 37 (27,4%), низька передня резекція – 16 (11,6%) хворим, черевно-анальна резекція прямої кишки із низьведенням ободової кишки на проміжність – 15 (11,1%) хворим, проктектомія із формуванням коло анального анастомозу – 8 (5,9%) хворим, екстирпація прямої кишки – 48, обструктивна резекція прямої кишки – 11 (8,1%) хворим табл. 2.2.

Таблиця 2.2

Розподіл хворих на РПК за характером проведеного хірургічного лікування

Хірургічне лікування	Кількість хворих
Через черевна резекція прямої кишки	37 (27,4%)
Низька передня резекція	16 (11,6%)
Черевно-анальна резекція прямої кишки із низьведенням ободової	15 (11,1%)
Проктектомія із формуванням коло анального анастомозу	8 (5,9%)
Екстирпація прямої кишки	48 (35,5%)
Обструктивна резекція прямої кишки	11 (8,1%)
Хірургічне лікування на етапі прогресії захворювання	
атипова резекція печінки	4 (3,0%)
білобарна сегментарна резекція печінки	3 (2,2%)
правобічна гемігепатоектомія	2 (1,5%)
лівобічна гемігепатоектомія	1 (0,7%)
торакоскопічне видалення метастатичних вогнищ в легенях	1 (0,7%)

Розподіл хворих на РПК за характером проведеної променевої терапії

На етапі передопераційної терапії 135 (100%) хворих отримало дрібно фракційні курси телегаматерапії. Однак 2 (2,2%) хворих отримали післяопераційний паліативний курс телегаматерапії з приводу локального рецидиву хвороби на місці резекції (період 18- 36 місяців).

2.3. Характер післяопераційного медикаментозного лікування

Післяопераційна ад'ювантна поліхіміотерапія проводилась як за стандартною так і за індивідуалізованими схемами, . Маючи за стандартну

ад'ювантну схему поліхіміотерапію FOLFOX-6 без урахування можливості оцінки ймовірної ефективності. Під індивідулізованою схемою використовуються ад'ювантні схеми поліхіміотерапії FOLFOX-6 чи FOLFIRI, але з урахуванням біомаркерів передбачуваної чутливості. табл. 2.3.

Таблиця 2.3

**Розподіл хворих на РПК за характером проведеного
медикаментозного лікування**

Види лікування	Кількість хворих
<i>Поліхіміотерапія</i>	
Стандартна FOLFOX-6	82 (60,7%)
Індивідуалізована (FOLFOX-6 чи FOLFIRI)	53 (39,3%)
Паліативна на етапі прогресії захворювання	65 (48,1%)
<i>Терапія супроводу</i>	
Ербісол ультра-фарм	26 (19,2%)

Дане клінічне дослідження передбачало застосування тих чи інших варіантів медикаментозного лікування із врахуванням експресії певних молекулярно-біологічних маркерів, які характеризують лікарську резистентність (рівень експресії Е-кадгерину, Топоізомерази II альфа (Торо II α), ERCC1).

Дизайн даного клінічного дослідження передбачав розподіл хворих на три групи:

50 хворих - ретроспективна група хворих, в яких було проведено дослідження рівня експресії маркерів чутливості/резистентності в пухлинних клітинах та застосована ад'ювантною стандартна схема поліхіміотерапії FOLFOX-6;

53 хворих - проспективна група хворих, в яких також були проведені дослідження рівня експресії маркерів чутливості/резистентності в пухлинних клітинах та згідно передбачуваної ефективності застосовані індивідуалізовані схеми поліхіміотерапії FOLFOX-6 (30 хворих) або FOLFIRI (23 хворих);

32 хворих – контрольна група хворих, в яких не проводилось дослідження рівня експресії маркерів чутливості/резистентності в пухлинних клітинах і післяопераційна поліхіміотерапія проведена за стандартною схемою FOLFOX-6 таб.2.4.

Таблиця 2.4

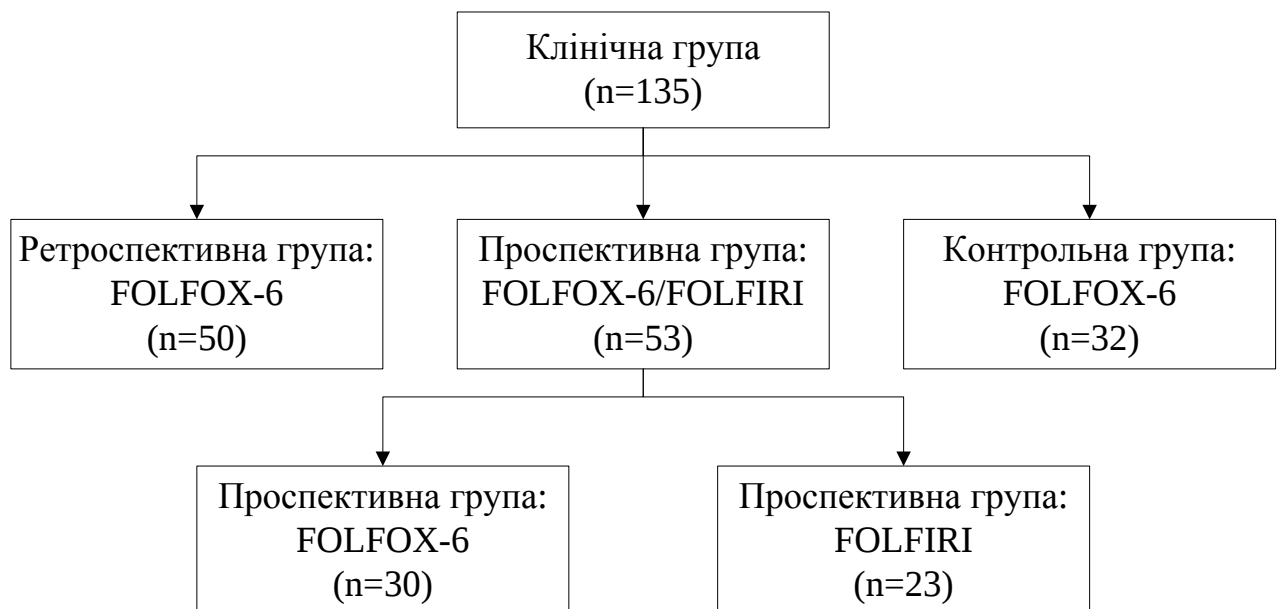


Рис. 2.3. Дизайн клінічного дослідження

Розподіл хворих РПК ретроспективної та проспективної груп за характером проведеного медикаментозного лікування висвітлено в табл. 2.5.

Таблиця 2.5

Розподіл хворих РПК за характером проведеного медикаментозного лікування

Вид лікування	Кількість хворих
<i>Хіміотерапія (в ад'ювантному режимі):</i>	
FOLFOX-6: <i>1 день:</i> оксаліплатин 85 мг/м² внутрішньовенно в 250 мл 5% р-на глюкози протягом 2 годин одночасно із введенням лейковорина Лейковорин 400 мг/м² в 200-500 мл 0,9% NaCl или 5% р-на глюкози внутрішньовенно крапельно протягом 2 годин 5-фторурацил 400 мг/м² - внутрішньовенно болюсно (протягом 1-2 хвилин) після інфузії лейковорина, потім тривала інфузія 2400 мг/м² в 100-1000 мл 0,9% р-на NaCl або 5% р-на глюкози протягом 46 годин. <i>Проводили кожні 2 тижні.</i>	112
FOLFIRI: <i>1 день:</i> Лейковорин 400 мг/м² - в 25-500 мл 0,9% NaCl або 5% р-на глюкози внутрішньовенно крапельно протягом 2 годин 5-фторурацил 500 мг/м² - внутрішньовенно болюсно (протягом 1-2 хвилин) після інфузії лейковорина, після чого тривала інфузія 2400-3000 мг/м² в 100-1000 мл 0,9% р-на 0,9% NaCl або 5% р-на глюкози протягом 46 годин. Іринотекан 180 мг/м² - в 250-500 мл 5% р-на глюкози або 0,9% р-на NaCl внутрішньовенно протягом 90 хвилин.	23

Проводили кожні 2 тижні	
<i>Медикаментозна терапія на етапі прогресії у хворих з метастатичним ураженням печінки</i>	
5-фторурацил 600 мг/м ² /сут. в/в течение 1-2 мин. через час после введения Лейковорина /1-й день/ Препараты вводят 1 раз в неделю в течение 6 недель. Затем 2 месяца перерыв и курс повторяется. Всего 4 курса.	43
Комбіноване лікування ТГТ та ПХТ з фторпірімідінами в поєднанні з лейковорином (схема ROSWELL PARK)	7
У ретроспективній групі хворих з продовженням хвороби проводилась паліативна схема FOLFIRI	15
ЭРБИСОЛ УЛЬТРА циклами - в/м 2 раза на день по 2 мл (1 ампула) вранці та в вечері в продолж 5-ти днів з інтервалом 2 дні, під час яких препарат вводять в/м 1 раз на день увечері по 2 мл. З початку та вкінці лікування препарат призначають в/м 1 раз на день по 2 мл (1 ампула) увечері в продолж 3-х днів. 1 курс 8 циклів (6 циклів комплексно з химиотерапією + 2 цикли після ПХТ). Наступні курси починають разом з курсами ПХТ. Усього 4 курси.	26

65 пацієнтів у яких спостерігалось продовження хвороби: з яких прооперировані 11 хворих з поодинокими метастатичними вогнищами печінки та легенів (3 у групі ретроспективного спостереження), 47 рецидивів на місці резекції в комбінації з віддаленими метастазами, 43 з яких ураження печінки та 4 випадки з ураженням легенів. 7 випадки продовження хвороби в місці резекції.

У 43 хворих на метастатичне ураження печінки була застосована паліативна хіміотерапія фторпірімідінами в поєднанні з лейковорином (схема ROSWELL PARK), при цьому в 26 хворих лікування було доповнене включенням у

лікувальні схеми препарату Ербісол ультра-фарм. Іншим 15 хворих із прогресією захворювання було застосоване медикаментозне лікування, яке передбачало конверсію хіміотерапії на схему FOLFIRI за умов коли ад'ювантна хіміотерапія проводилась за стандартною схемою FOLFOX-6. Хірургічне лікування на етапі прогресування (8-16 місяців) у хворих з метастатичним ураженням печінки передбачало проведення атипової резекції органу у 4 хворих, білобарної сегментарної резекції у 3 хворих, правобічної гемігепатоектомії - у 2 хворих та лівобічної гемігепатоектомії у - 1 хворого. Торакоскопічне видалення метастатичних вогнищ в легенях проведено у 1 хворого. У 7 пацієнтів при виникненні локальних рецидивів (місце резекції, локальний рецидив) була проведена променева терапія та паліативні курси хіміотерапії (схема ROSWELL PARK).

2.4. Імуногістохімічні методи

Визначення експресії маркерів лікарської резистентності в пухлинних клітинах у хворих на РПК ретроспективної групи (50 хворих) проводили шляхом дослідження біопсійного матеріалу перед початком лікування та після операційного дослідження видаленої пухлини.

Визначення експресії маркерів в пухлинних клітинах у хворих на РПК проспективної групи проводили шляхом дослідження виключно біопсійного матеріалу перед початком лікування.

Аналіз імунофенотипу досліджуваних пухлин проводилося за участю лабораторії модельних систем експериментальної онкології ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України (керівник лабораторії проф., д.б.н. Ю.Й. Кудрявець).

Імунофенотип в гістологічних зрізах первинних пухлин оцінювали за допомогою класичного імуногістохімічного методу за визначенням експресії Е-кадгерину (Thermo Scientific, США), Топо IIα (Thermo Scientific, США), ERCC1

(Abcam), Twist (GenTex, США), CD44 (Thermo Scientific, США) та β -catenin (Thermo Scientific, США). Дослідження проводили на паралельних, депарафінованих зрізах із застосуванням непрямого імунопероксидазного методу згідно рекомендацій [166]. Для проведення ІГХ реакцій використовували стандартний одноетапний протокол з демаскуванням антигенів в цитратному буфері pH 6,0 у мікрохвильовій печі. Методика візуалізації білків включала наступні етапи: для видалення парафіну скельця занурювали у дві порції ксилолу по 10-15 хв з наступною дегідrataцією у спирті, промивали дистильованою водою по 3 хв та демаскували антигени в цитратному буфері (pH 6,0) у мікрохвильовій печі. Охолоджували препарати при кімнатній температурі та промивали дистильованою водою. Після чого проводили блокування ендогенної пероксидази 3,0% розчином перекису водню, промивали у дистильованій воді з наступною промивкою у фосфатному буфері (pH 7,4-7,8). Блокування неспецифічних білків здійснювали шляхом інкубації зрізів у 1,0% розчині сироватки бичачого альбуміну протягом 30 хв. при кімнатній температурі. МкАТ наносили на зрізи в розведеннях і на час згідно з інструкцією виробника, після цього застосовували систему візуалізації Poly Vue (ThermoScientific, ОПТЕК) і виявляли присутність ферменту із застосуванням в якості субстрату діамінобензидина (ThermoScientific, ОПТЕК). Результат оцінювали напівкількісним методом за відсотком позитивно забарвлених пухлинних клітин в полі гістологічного зрізу і оцінювали за допомогою методу H-Score:

$$S = 1 \times A + 2 \times B + 3 \times C,$$

де S - показник «H-Score», показник якого варіює в межах від 0 (відсутність експресії) до 300 (висока експресія в 100% клітин).

2.5. Статистична обробка результатів

Аналіз впливу окремих фенотипових характеристик пухлинних пухлин на перебіг пухлинного процесу проведено за допомогою кореляційного аналізу. Даний метод дозволяє статистично дослідити взаємозв'язок між двома випадковими величинами і кількісно оцінити ступінь та напрямок даної залежності за допомогою коефіцієнтів кореляції. Під напрямком розуміється тип взаємозв'язку – прямо- або обернено пропорційний. Використані типи кореляції Пірсона та непараметрична кореляція Спірмана. Вибір коефіцієнту відбувався після перевірки типу розподілу даних за допомогою статистичного критерію Колмогорова-Смірнова [167, 168].

Для визначення рівня експресії фенотипових характеристик пухлинних пухлин, які є граничними для віднесення пацієнтів до групи підвищеного ризику застосовано ROC-аналіз. Даний метод застосовують при аналізі бінарних подій, у випадку, коли необхідно розділити два класи. Один з класів називають класом з позитивними наслідками (ремісія, вижив та ін.), другий – з негативними наслідками (рецидив, смертельний випадок та ін.). ROC-крива показує залежність кількості вірно класифікованих позитивних прикладів від кількості невірно класифікованих негативних прикладів.

ROC-аналіз представляє собою графічну методику оцінки точності розділення за допомогою показників чутливості та специфічності, які показують, скільки позитивних та негативних наслідків будуть вірно виявлені класифікатором. Показники чутливості та специфічності є показниками діагностичної ефективності визначеного рівня експресії. Чутливість визначає долю хворих, у яких була вірно визначено відсутність негативного перебігу пухлинного процесу, а той час як специфічність свідчить про долю вірно класифікованих хворих з прогресом захворювання.

Головною метою ROC-аналізу є мінімізація помилок класифікації за допомогою знаходження точки відсічення (граничного порогу, що розділяє класи), що дозволить з найбільшою ймовірністю розпізнавати позитивні та

негативні наслідки. Площа під ROC-кривою (Area Under Curve, AUC) є характеристикою якості класифікації при розрахованому порозі. Чим більше значення AUC, тим «краще» розрахована границя розділяє хворих з різних класів.

Для прогнозування перебігу пухлинного процесу в залежності від комплексів фенотипових характеристик застосовано метод бінарної логістичної регресії. Даний статистичний метод моделювання застосовується для передбачення події по значенням множини ознак (незалежних змінних або предикторів), на основі яких розраховується ймовірність віднесення хворого до групи низького або високого ризику.

Бінарна логістична модель має вигляд:

$$p = \frac{1}{1 + e^{-y}},$$

де p – розрахована ймовірність настання деякої події (в нашому випадку настання прогресу або смерть хворого), e – основа натуральних логарифмів 2,713, y – стандартне рівняння регресії.

Розрахована ймовірність приймає значення в межах від 0 до 1. При значеннях $p > 0,5$, припускається, що подія з високою ймовірністю настане, в протилежному випадку – що ні.

Підсумок

В роботі використані стандартні схеми комплексного лікування хворих на колоректальний рак, з урахуванням стадії та повністю в межах передбачених стандартами для лікування РПК. До комплексного лікування хворих РПК віднесено: передопераційний курс променевої терапії (40-50 Гр), хірургічне втручання за об'ємом в залежності від локалізації, та расповсюдження первинного вогнища, та післяопераційного хіміотерапевтичного лікування. Особливістю данної роботи вважається використання індивідулізованого підходу до вибору однієї зі стандартних ад'ювантних схеми поліхіміотерапії FOLFOX-6 чи FOLFIRI. Для оцінки ефективності використаного алгоритма

сформована так звана контрольна група пацієнтів яким проводилася в межах комплексного лікування стандартна схема хіміотерапії FOLFOX-6.

В період після проведеного комплексного лікування усіх хворих період спостереження складав 3 роки з оцінкою можливості продовження хвороби (наявності віддалених метастазів чи рецидивів в місці первинної локалізації пухлини). В разі наявності продовження хвороби хворим проводили хірургічне лікування, променеве лікування та паліативні курси хіміотерапії.

Основні положення даного розділу висвітлені у наступних публікаціях [169-171].

РОЗДІЛ 3

АНАЛІЗ ПЕРЕБІГУ ЗАХВОРЮВАННЯ У ХВОРИХ НА РАК ПРЯМОЇ КИШКИ В ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД ЕКСПРЕСІЇ МОЛЕКУЛЯРНО- БІОЛОГІЧНИХ МАРКЕРІВ ЛІКАРСЬКОЇ РЕЗИСТЕНТНОСТІ

На сьогоднішній день, питання про підвищення ефективності медикаментозного лікування хворих на РПК є важливою проблемою, оскільки саме воно є ключовим моментом лікування цього захворювання і саме його ефективність є вирішальним чинником, який впливає на виживаність цієї категорії хворих. Суттєвою перешкодою на шляху застосування тих чи інших протипухлинних препаратів є стійкість з боку пухлини, яку характеризують як лікарську резистентність, тобто здатність пухлинних клітин зберігати свою життєздатність. Це, в свою чергу супроводжується подальшою прогресією захворювання.

Переважає більшість злоякісних пухлин кишківника має властивості природної лікарської резистентності. Велика питома вага пухлин, набуває цю лікарську резистентність в процесі лікування. В арсеналі сьогоднішньої пухлинної терапії є достатня кількість препаратів різного походження та різного механізму дії, що спричиняє різну адаптацію пухлинної клітини до дії цих препаратів. Саме ця адаптація, яка і формує лікарську резистентність слугує головною перешкодою на шляху ефективної медикаментозної терапії, а подолання цієї перешкоди може суттєво покращити ефективність медикаментозного лікування хворих на РПК.

В даній дослідницькій роботі ми поставили собі за мету у переважній більшості пацієнтів на рак прямої кишки до початку лікування визначити експресію певних маркерів в її пухлинних клітинах з тим, щоб призначити саме ті медичні засоби до яких пухлина «по можливості» не буде резистентною.

Подібна індивідуалізація побудована за умов врахування молекулярно-біологічних особливостей пухлинних клітин. На нашу думку, це один із шляхів

подолання лікарської резистентності, що зможе призвести до підвищення ефективності медикаментозного лікування у хворих на РПК. А пошук різних маркерів, які визначають прогноз захворювання та ефективність лікування дає можливість провести підбір хворих для ад'ювантної хіміотерапії.

Оскільки, базовими препаратами сучасного медикаментозного лікування хворих на РПК залишаються оксаліплатин, іринотекан та фторпіримідин, то важливим моментом є дослідження ключових регуляторів, які впливають на дію цих препаратів. До таких регуляторів відносять:

- сімейство топоізомераз I і II;
- ферменти репарацій ДНК при пошкодженні цитостатиками, які беруть участь у формуванні лікарської резистентності - ERCC1, ERCC2;
- експресії E-кадгерину та Twist, динаміка яких характеризує епітеліально-мезенхімальний перехід злоякісно трансформованих клітин.

Варто зауважити, що в процесі дослідницької роботи додатково було проаналізовано вплив CD44 та β -catenin на загальну та безрицидивну виживаність, однак жодних закономірностей виявлено не було.

В процесі лікування 135 хворих на РПК, в стадії захворювання $T_{1-4}N_{0-2}M_0$ всі хворі були розподілені на три групи: ретроспективну (50 хворих), проспективну (53 хворих) та контрольну (32 хворих).

Хворі ретроспективної та контрольної груп в післяопераційному періоді лікувалися за стандартною схемою ПХТ FOLFOX-6. Лікування хворих проспективної групи в післяопераційному періоді було забезпечено шляхом проведення індивідуалізованої поліхіміотерапії за схемою FOLFOX-6 (30 хворих) та індивідуалізованої поліхіміотерапії за схемою FOLFIRI (23 хворих).

3.1. Загальна характеристика хворих ретроспективної групи

Аналіз 50 пацієнтів ретроспективної групи проводився шляхом вивчення документації історій хвороб та карт амбулаторного спостереження хворих, які

знаходились на лікуванні в Краматорському онкологічних диспансерах протягом 2009-2015 років.

Середній вік пацієнтів – 57,2 року (від 37 до 81 року). Серед хворих були 24 жінки (48%) і 26 чоловіків (52%).

Таблиця 3.1.

Клініко-морфологічна характеристика хворих на РПК ретроспективної групи

Характеристика хворих		Кількість хворих
Стать	чоловіки	26 (52%)
	жінки	24 (48%)
Середній вік		57,2±11,7
<i>Локалізація пухлинного процесу в прямій кишці:</i>		
Верхньоампулярний відділ		27 (54%)
Середньоампулярний		15 (30%)
Нижньоампулярний		8 (16%)
<i>Гістологічна структура пухлини:</i>		
Високодиференційована аденокарцинома		15 (30%)
Середньодиференційована аденокарцинома		22 (44%)
Низькодиференційована аденокарцинома		13 (26%)
<i>Стадія захворювання:</i>		
I	T ₂ N ₀ M ₀	4 (8,0%)
II-A	T ₃ N ₀ M ₀	24 (48,0%)
II-B	T ₄ N ₀ M ₀	2 (4,0%)
III-A	T ₁ N ₁ M ₀	3 (6,0%)
	T ₂ N ₁ M ₀	7 (14,0%)
	T ₂ N ₂ M ₀	3 (5,0%)
III-B	T ₃ N ₁ M ₀	5 (10,0%)
	T ₃ N ₂ M ₀	2 (4,0%)
	T ₄ N ₁ M ₀	0 (0%)
	T ₄ N ₂ M ₀	0 (0%)

Гістологічно всі пухлини були верифіковані як аденокарциноми (26% низькодиференційований рак, 44% помірнодиференційований, 30% - високодиференційований) (табл. 3.1).

50 (100%) хворим проведено передопераційний курс телегаматерапії в СВД 40 Грей. Оперативне лікування проводилось через 30 – 60 діб після завершення радіотерапії.

В післяопераційному періоді хворим проведена ад'ювантна ПХТ за схемою FOLFOX-6. Від кожного пацієнта ще до початку лікування отримана згода на можливість використання біопсійного матеріалу та інформаційних даних для аналізу і ретроспективного вивчення.

Аналіз клінічного перебігу захворювання проводився на протязі 36 місяців від початку лікування. Із загальної кількості хворих відсутність проявів захворювання констатовано у 30 (60%) пацієнтів і у 20 (40%) виявлено його прогресію (рис. 3.1). За характером маніфестації в 16 (32%) хворих діагностували метастатичне ураження печінки, зафіксовано 1 (2%) локальний рецидив після операції Гартмана, а також метастатичне ураження легень у 3 (6%) хворих. Із 16 хворих з метастатичним ураженням печінки в 3 випадках було проведене оперативне лікування в об'ємі правобічної гемігепатоктомії (1 хворий), атипова резекція печінки (1 хворий), білобарна сегментарна резекція (1 хворий). Усім 20 пацієнтам з продовженням хвороби була проведена паліативна хіміотерапія за схемою ROSSVEL- Park (фторпірімідини поєднувались із застосуванням препарату Ербісол Ультра-фарм). 1 пацієнт прооперований з приводу солітарного вогнища в лівій легені, в якому в умовах торокального відділення проведено тораскопічне видалення патологічного вогнища.

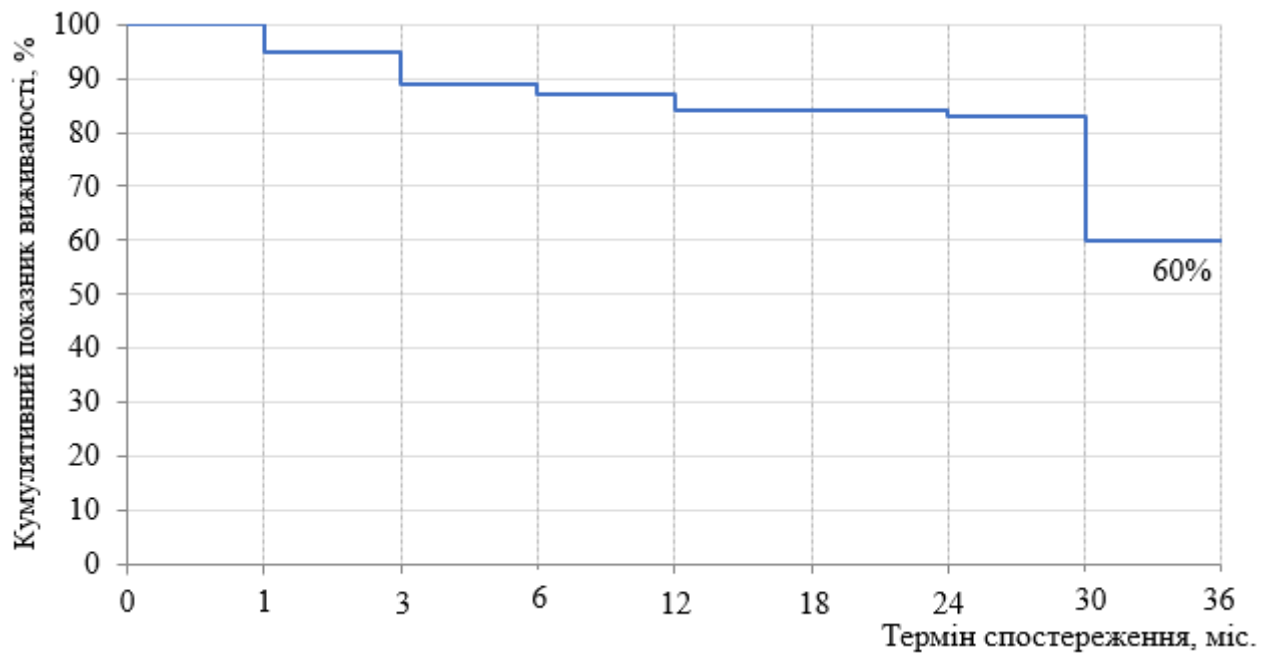


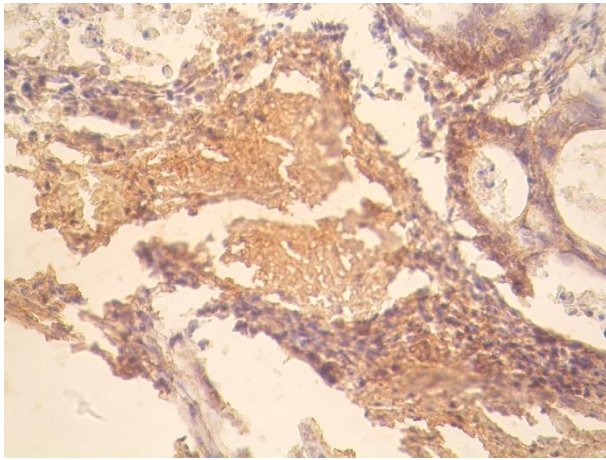
Рис. 3.1. Актуарна крива безрецидивної виживаності хворих на РПК за Капланом-Майєра в групі хворих ретроспективної групи

3.2. Дослідження взаємозв'язку між експресією маркерів ЕМП пухлинних клітин та білками медикаментозної резистентності з метою оцінки прогнозу перебігу захворювання у хворих на рак прямої кишки

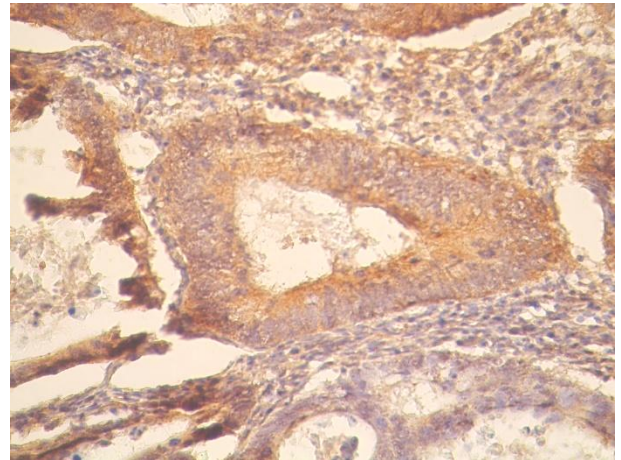
Виходячи з питань, що поставлені в даній роботі, були досліджені наступні антигени, що характеризують імунофенотип пухлинних клітин РПК: Twist, Е-кадгерин, ERCC1, Торо II-α. Вказані фенотипові ознаки пухлинних клітин було проаналізовано у співставленні з даними щодо перебігу пухлинного процесу, а саме з наявністю прогресії захворювання або безрецидивного періоду на час спостереження та з 3-річною загальною виживаністю залучених у дослідження на РПК.

На рисунках нижче наведені результати дослідження експресії антигенів в клітинах пухлини хворих на РПК.

На рис. 3.2 наведені дані аналізу зразку, на якому виявлено експресію Е-кадгерина в клітинах пухлини хворого на РПК.



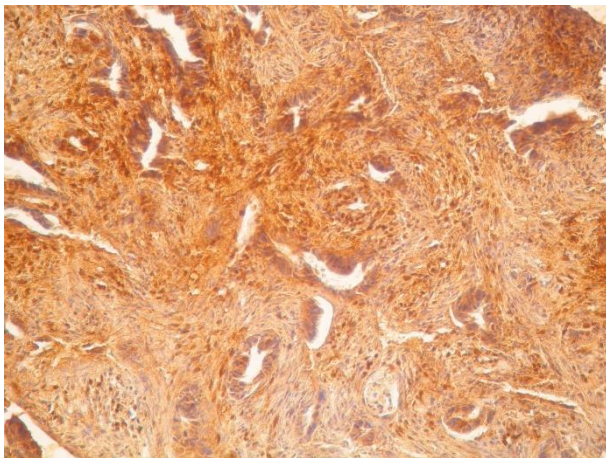
(a)



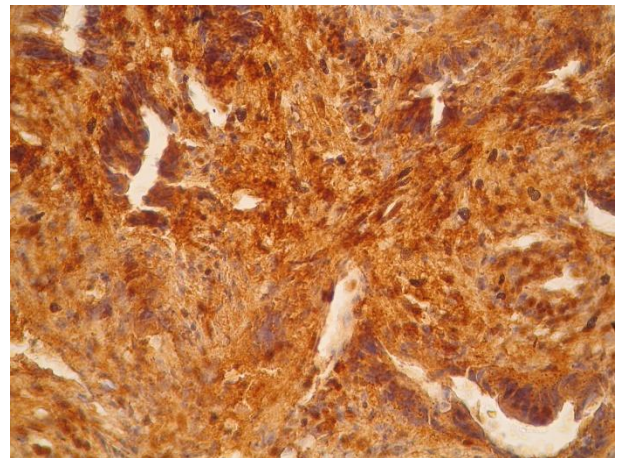
(б)

Рис. 3.2. Експресія Е-кадгерина в клітинах пухлини хворих на РПК.

На рис. 3.3 наведені дані аналізу зразку, на якому виявлено експресію ERCC1 в клітинах пухлини хворих на РПК.



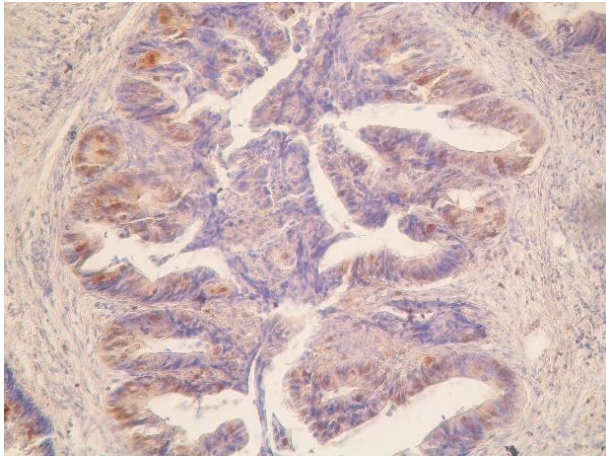
(a)



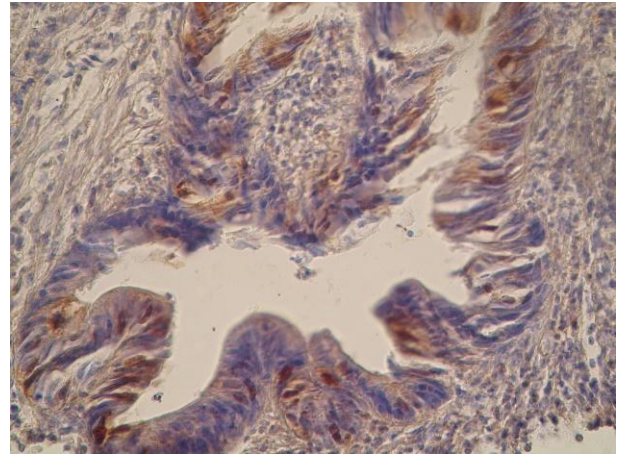
(б)

Рис. 3.3 Експресія ERCC1 в клітинах пухлини хворих на РПК.

На рис. 3.4 наведені дані аналізу зразку, на якому виявлено експресію Торо Іа в клітинах пухлини хворого на РПК.



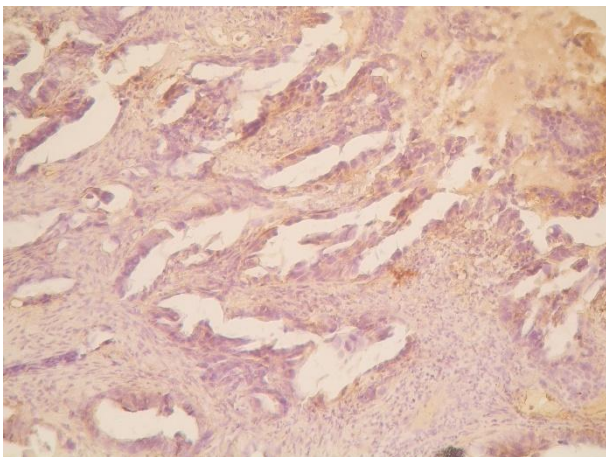
(a)



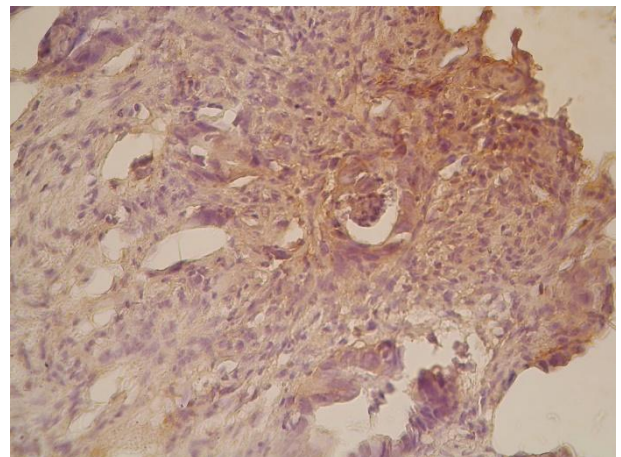
(б)

Рис. 3.4 Експресія Торо Па в клітинах пухлини хворих на РПК.

На рис. 3.5 наведені дані аналізу зразку, на якому виявлено експресію TWIST в клітинах пухлини хворого на РПК.



(a)



(б)

Рис. 3.5 Експресія TWIST в клітинах пухлини хворих на РПК.

В даному підрозділі наведені результати дослідження зв'язку між експресією маркерів ЕМП пухлинних клітин і білками, що асоційовані з лікарською резистентністю, а також аналіз їх прогностичної значимості в перебігу пухлинного процесу у хворих на РПК.

Розподіл 50 хворих за експресією маркерів пухлинних клітин наведено нижче. Рис.3.6

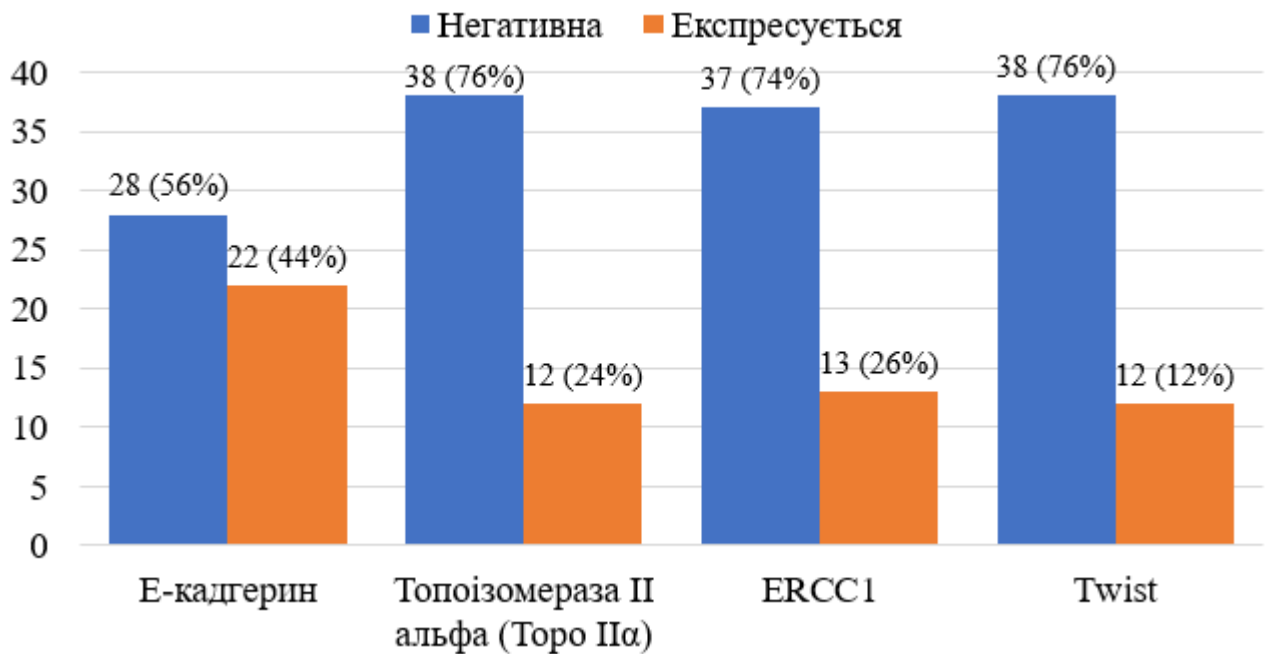


Рис. 3.6 Розподіл хворих ретроспективної групи за експресією маркерів пухлинних клітин

На першому етапі дисертаційного дослідження вивчено взаємозв'язок між клініко-морфологічною характеристикою хворих та експресією антигенів, що характеризують імунофенотип пухлинних клітин РПК: Е-кадгерин, ERCC1, Торо II-α, Twist.

Всі хворі були розподілені за віковою ознакою та проаналізовано можливість наявності зв'язку між наявністю експресії антигенів та віком пацієнта. Як видно, з табл. 3.2-3.5 виявити статистично значимий зв'язок не вдалося.

Таблиця 3.2

Експресія Е-кадгерину у хворих на РПК в залежності від вікової групи

Вікова група	Негативний (n=28)		Експресується (n=22)	
<30	0	0	0	0
31-40	4	14,3	0	0
41-50	8	28,6	8	36,4
51-60	11	32,3	9	40,9
61-70	4	14,3	5	22,7
>71	1	3,6	0	0

Примітка: * - різниця між групами статистично не значима на рівні $p=0,451$

Таблиця 3.3

Експресія Торо Па у хворих на РПК в залежності від вікової групи

Вікова група	Негативний (n=38)		Експресується (n=12)	
<30	0	0	0	0
31-40	3	7,9	1	8,3
41-50	12	31,6	4	33,3
51-60	15	39,5	5	41,7
61-70	7	18,4	2	16,7
>71	1	2,6	0	0

Примітка: * - різниця між групами статистично значима на рівні $p=0,365$

Таблиця 3.4

Експресія ERCC1 у хворих на РПК в залежності від вікової групи

Вікова група	Негативний (n=37)		Експресується (n=13)	
<30	0	0	0	0
31-40	2	5,4	2	15,4
41-50	11	29,7	5	38,5
51-60	14	37,8	6	46,1
61-70	5	13,5	4	30,7
>71	1	2,7	0	0

Примітка: * - різниця між групами статистично значима на рівні $p=0,102$

Таблиця 3.5

Експресія Twist у хворих на РПК в залежності від вікової групи

Вікова група	Негативний (n=38)		Експресується (n=12)	
<30	0	0	0	0
31-40	3	7,9	1	8,3
41-50	11	28,9	5	41,7
51-60	17	44,7	3	25
61-70	7	18,4	2	16,7
>71	1	2,6	0	0

Примітка: * - різниця між групами статистично значима на рівні $p=0,533$

Провівши аналіз взаємозв'язку між наявністю експресії у антигенів і стадією захворювання не було виявлено статистично значимий зв'язок (табл. 3.6 -3.9).

Таблиця 3.6

**Експресія Е-кадгерину у хворих на РПК в залежності від стадії
захворювання**

Стадія захворювання	Негативний (n=28)		Експресується (n=22)	
	n	%	n	%
I	2	7,1	2	9,1
II	14	50	12	54,5
III	12	42,9	8	36,4

Примітка: * - різниця між групами статистично не значима на рівні $p=0,888$

Таблиця 3.7

**Експресія Торо Па у хворих на РПК в залежності від стадії
захворювання**

Стадія захворювання	Негативний (n=38)		Експресується (n=12)	
	n	%	n	%
I	3	7,9	1	8,3
II	21	55,3	5	41,7
III	14	36,8	6	50

Примітка: * - різниця між групами статистично не значима на рівні $p=0,697$

Таблиця 3.8

**Експресія ERCC1 у хворих на РПК в залежності від стадії
захворювання**

Стадія захворювання	Негативний (n=37)		Експресується (n=13)	
	n	%	n	%
I	3	8,1	1	7,7
II	21	56,8	5	38,5
III	13	35,1	7	53,8

Примітка: * - різниця між групами статистично не значима на рівні $p=0,481$

Таблиця 3.9

**Експресія Twist у хворих на РПК в залежності від стадії
захворювання**

Стадія захворювання	Негативний (n=38)		Експресується (n=12)	
	n	%	n	%
I	2	5,3	2	16,6
II	21	55,3	5	41,7
III	15	39,4	5	41,7

Примітка: * - різниця між групами статистично не значима на рівні $p=0,403$

При аналізі наявності Е-кадгерину, Торо IIα, Twist у хворих на РПК в залежності від категорії Т не вдалося виявити жодної достовірної закономірності (табл. 3.10-3.13). Однак, у хворих з поширенням пухлинного процесу, яке відповідало категорії Т₃ кількість пацієнтів з негативним ERCC1 майже в тричі перевищувала кількість хворих у яких виявлена експресія (75,7% проти 23,1%). Водночас, у 15,4% хворих з експресією даного антигена виявлено категорію Т₄.

Таблиця 3.10

**Експресія Е-кадгерину у хворих на РПК в залежності від категорії Т
(класифікація TNM, 2009 рік, 7 видання)**

Т	Негативний (n=28)		Експресується (n=22)	
1	3	10,7	0	0,0
2	8	28,6	6	27,3
3	16	57,1	15	68,2
4	1	3,6	1	4,5

Примітка: * - різниця між групами статистично не значима на рівні $p=0,451$

Таблиця 3.11

Експресія Торо Па у хворих на РПК в залежності від категорії Т
(класифікація TNM, 2009 рік, 7 видання)

T	Негативний (n=38)		Експресується (n=12)	
1	3	7,9	0	0
2	8	21,1	6	50
3	26	68,4	5	41,7
4	1	2,6	1	8,3

Примітка: * - різниця між групами статистично значима на рівні $p=0,140$

Таблиця 3.12

Експресія ERCC1 у хворих на РПК в залежності від категорії Т
(класифікація TNM, 2009 рік, 7 видання)

T	Негативний (n=37)		Експресується (n=13)	
1	1	2,7	2	15,4
2	8	21,6	6	46,2
3	28	75,7	3	23,1
4	0	0	2	15,4

Примітка: * - різниця між групами статистично значима на рівні $p=0,002$

Таблиця 3.13

Експресія Twist у хворих на РПК в залежності від категорії Т
(класифікація TNM, 2009 рік, 7 видання)

T	Негативний (n=38)		Експресується (n=12)	
1	2	5,3	1	8,3
2	9	23,7	5	41,7
3	25	65,8	6	50,0
4	2	5,3	0	0

Примітка: * - різниця між групами статистично значима на рівні $p=0,533$

Аналогічно проведено аналіз закономірності виявлення експресії та категорії N, котра характеризує ступінь поширеності пухлинного процесу за межі первинного вогнища (табл. 3.14-3.17). Жодного зв'язку між виявленням антигенів та наявністю метастатичних регіонарних уражень не виявлено.

Таблиця 3.14

**Експресія Е-кадгерину у хворих на РПК в залежності від категорії N
(класифікація TNM, 2009 рік, 7 видання)**

N	Негативний (n=28)		Експресується (n=22)	
0	16	57,1	14	63,6
1	7	25	8	36,4
2	5	17,9	0	0

Примітка: * - різниця між групами статистично значима на рівні $p=0,103$

Таблиця 3.15

**Експресія Торо Па у хворих на РПК в залежності від категорії N
(класифікація TNM, 2009 рік, 7 видання)**

N	Негативний (n=38)		Експресується (n=12)	
0	24	63,2	6	50
1	11	28,9	4	33,3
2	3	7,9	2	16,7

Примітка: * - різниця між групами статистично значима на рівні $p=0,599$

Таблиця 3.16

**Експресія ERCC1 у хворих на РПК в залежності від категорії N
(класифікація TNM, 2009 рік, 7 видання)**

N	Негативний (n=37)		Експресується (n=13)	
0	24	64,9	6	46,2
1	9	24,3	6	46,2
2	4	10,8	1	7,6

Примітка: * - різниця між групами статистично значима на рівні $p=0,336$

Таблиця 3.17

**Експресія Twist у хворих на РПК в залежності від категорії N
(класифікація TNM, 2009 рік, 7 видання)**

N	Негативний (n=38)		Експресується (n=12)	
0	23	60,5	7	58,3
1	11	28,9	4	33,3
2	4	10,5	1	8,4

Примітка: * - різниця між групами статистично значима на рівні $p=0,947$

Провівши аналіз залежності між позитивною експресією Е-кадгерину, Торо ІІа, ERCC1 та Twist в залежності від локалізації пухлинного процесу в прямій кишці не вдалося виявити жодних закономірностей (табл. 3.18-3.21).

Таблиця 3.18

**Експресія Е-кадгерину у хворих на РПК в залежності від локалізації
пухлинного процесу в прямій кишці**

Локалізація	Негативний (n=28)		Експресується (n=22)	
Верхньоампулярний відділ	14	50,0	13	59,1
Середньоампулярний	10	35,7	5	22,7
Нижньоампулярний	4	14,3	4	18,2

Примітка: * - різниця між групами статистично не значима на рівні $p=0,380$

Таблиця 3.19

**Експресія Торо ІІа у хворих на РПК в залежності від локалізації
пухлинного процесу в прямій кишці**

Локалізація	Негативний (n=38)		Експресується (n=12)	
Верхньоампулярний відділ	20	52,7	7	58,4
Середньоампулярний	12	31,6	3	25,0
Нижньоампулярний	6	15,8	2	16,7

Примітка: * - різниця між групами статистично не значима на рівні $p=0,973$

Таблиця 3.20

**Експресія ERCC1 у хворих на РПК в залежності від локалізації
пухлинного процесу в прямій кишці**

Локалізація	Негативний (n=37)		Експресується (n=13)	
Верхньоампулярний відділ	22	59,4	5	35,5
Середньоампулярний	10	27	5	38,5
Нижньоампулярний	5	13,5	3	23,1

Примітка: * - різниця між групами статистично не значима на рівні $p=0,606$

Таблиця 3.21

**Експресія Twist у хворих на РПК в залежності від локалізації
пухлинного процесу в прямій кишці**

Локалізація	Негативний (n=38)		Експресується (n=12)	
Верхньоампулярний відділ	22	57,9	5	41,6
Середньоампулярний	10	26,3	5	41,7
Нижньоампулярний	6	15,8	2	16,7

Примітка: * - різниця між групами статистично не значима на рівні $p=0,739$

Аналогічно виглядають результати дослідження взаємозв'язку досліджуваних антигенів та гістологічної структури пухлини. Аналіз не показав достовірного статистично значимого зв'язку з типом аденокарциноми в таблицях 3.22-3.25

Таблиця 3.22

**Експресія Е-кадгерину у хворих на РПК в залежності від
гістологічної структури пухлини**

Структура	Негативний (n=28)		Експресується (n=22)	
Високодиференційована аденокарцинома	8	28,6	7	31,8
Середньодиференційована аденокарцинома	9	32,1	4	18,2
Низькодиференційована аденокарцинома	11	39,3	11	50

Примітка: * - різниця між групами статистично значима на рівні $p=0,525$

Таблиця 3.23

**Експресія Торо Па у хворих на РПК в залежності від гістологічної
структури пухлини**

Структура	Негативний (n=38)		Експресується (n=12)	
Високодиференційована аденокарцинома	12	31,6	3	25
Середньодиференційована аденокарцинома	8	21,1	5	41,7
Низькодиференційована аденокарцинома	18	47,4	4	33,3

Примітка: * - різниця між групами статистично значима на рівні $p=0,362$

Таблиця 3.24

Експресія ERCC1 у хворих на РПК в залежності від гістологічної структури пухлини (ретроспектива).

Структура	Негативний (n=37)		Експресується (n=13)	
Високодиференційована аденокарцинома	12	32,4	3	23,1
Середньодиференційована аденокарцинома	7	18,9	6	46,
Низькодиференційована аденокарцинома	18	48,6	4	30,8

Примітка: * - різниця між групами статистично значима на рівні $p=0,155$

Таблиця 3.25

Експресія Twist у хворих на РПК в залежності від гістологічної структури пухлини (ретроспектива)

Структура	Негативний (n=38)		Експресується (n=12)	
Високодиференційована аденокарцинома	12	31,6	3	25
Середньодиференційована аденокарцинома	9	23,7	4	33,3
Низькодиференційована аденокарцинома	17	44,7	5	41,7

Примітка: * - різниця між групами статистично значима на рівні $p=0,788$

Фенотипові ознаки пухлинних клітин було проаналізовано у співставленні з даними щодо перебігу пухлинного процесу хворих на РПК. В таблицях 3.26-3.27 наведені результати аналізу залежності перебігу післяопераційного періоду та виживаності від рівня досліджуваних антигенів. Аналіз проведено шляхом порівняння рівня експресії маркерів між групами за допомогою непараметричного критерію Манна-Уїтні.

Таблиця 3.26

Залежність перебігу післяопераційного періоду від рівня досліджених антигенів¹ (ретроспектива)

Маркер	Ремісія (n=30)	Продовження хвороби (n=20)	Знач., р.
Twist	0 (0; 20) [0; 80]	0 (0; 6,5) [0; 90]	0,512
Е-кадгерин	10 (0; 20) [0; 70]	0 (0; 0) [0; 50]	0,048 ²
ERCC1	0 (0; 3) [0; 70]	40 (0; 70) [0; 90]	0,045 ²
Торо II-α	0 (0; 10) [0; 35]	10 (0; 25) [0; 90]	0,032 ²

Примітка: 1 – медіана (25%; 75%) [мінімум; максимум]; 2 - різниця між групами статистично значима.

Поодинокі показники експресії обраних маркерів (значимість показників) свідчать про потенційну придатність використання в подальшому аналізі ймовірних комбінацій їх прогностичну цінність.

Таблиця 3.27

Залежність виживаності від рівня досліджених антигенів¹

Маркер	Ремісія (n=30)	Продовження хвороби (n=20)	Знач., р.
Twist	0 (0; 20) [0; 80]	0 (0; 8,25) [0; 90]	0,512
Е-кадгерин	13 (0; 14,5) [0; 70]	0 (0; 0) [0; 50]	0,047 ²
ERCC1	0 (0; 4,5) [0; 70]	25 (0; 70) [0; 90]	0,017 ²
Торо II-α	0 (0; 8,75) [0; 35]	15 (0; 32,5) [0; 90]	0,012 ²

Примітка: 1 – медіана (25%; 75%) [мінімум; максимум]; 2 - різниця між групами статистично значима.

Значимість за показниками виживаності також підтверджують ймовірність прогнозування ефективності проведення хіміотерапії хворим на РПК.

Аналізуючи дані ретроспективного аналізу, можна зробити заключення, що для прогнозування перебігу пухлинного процесу, а саме для оцінки ризику

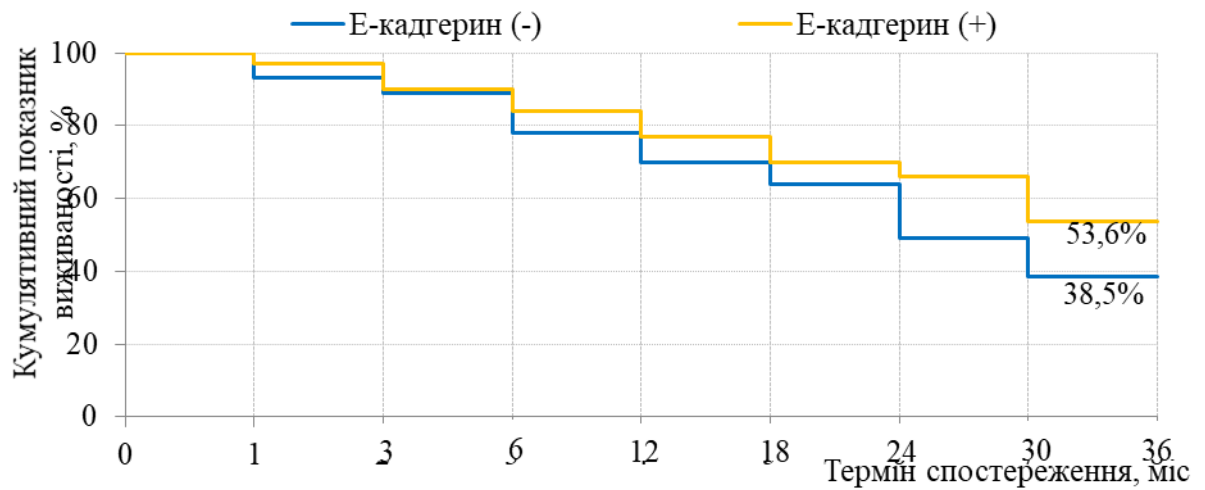
прогресії захворювання або виживаності, найбільш інформативними є показники Е-кадгерин, ERCC1 та Торо ІІа.

Е-кадгерин є маркером епітеліальних клітин і його наявність в пухлинних клітинах найчастіше свідчить про зниження їх метастатичного потенціалу та менш агресивну поведінку.

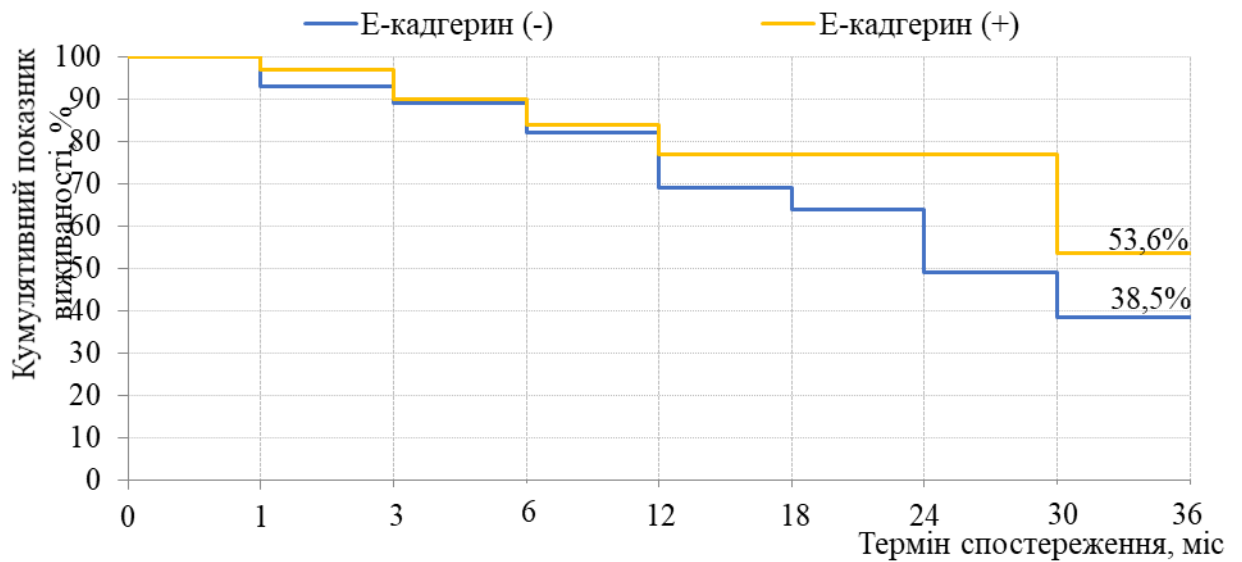
Транскрипційний фактор Twist, (антагоніст Е-кадгерину), найчастіше виявляється в клітинах з агресивним мезенхімальним фенотипом та активується саме за наявності процесу ЕМП в ПК при набутті ними метастатичної активності. Антиген Twist є негативним прогностичним маркером щодо перебігу пухлинного процесу в комплексі з іншими маркерами, але як монофактор він за результатами нашого дослідження не є достовірним (табл. 3.29). Цей факт узгоджується з даними інших авторів щодо ролі транскрипційного фактору Twist як негативного прогностичного маркеру у хворих на рак.

Однак, залишається відкритим питання про значення рівня досліджуваних факторів, яке можна вважати критичним для настанням ускладненого перебігу захворювання, а також їх комбінація, яку можна вважати найбільш несприятливою.

Криві виживаності хворих на колоректальний рак за Капланом-Майером залежно від характеру експресії маркерів лікарської стійкості та білків і транскрипційного фактору, асоційованих з ЕМП наведені на рис. 3.7-3.10.

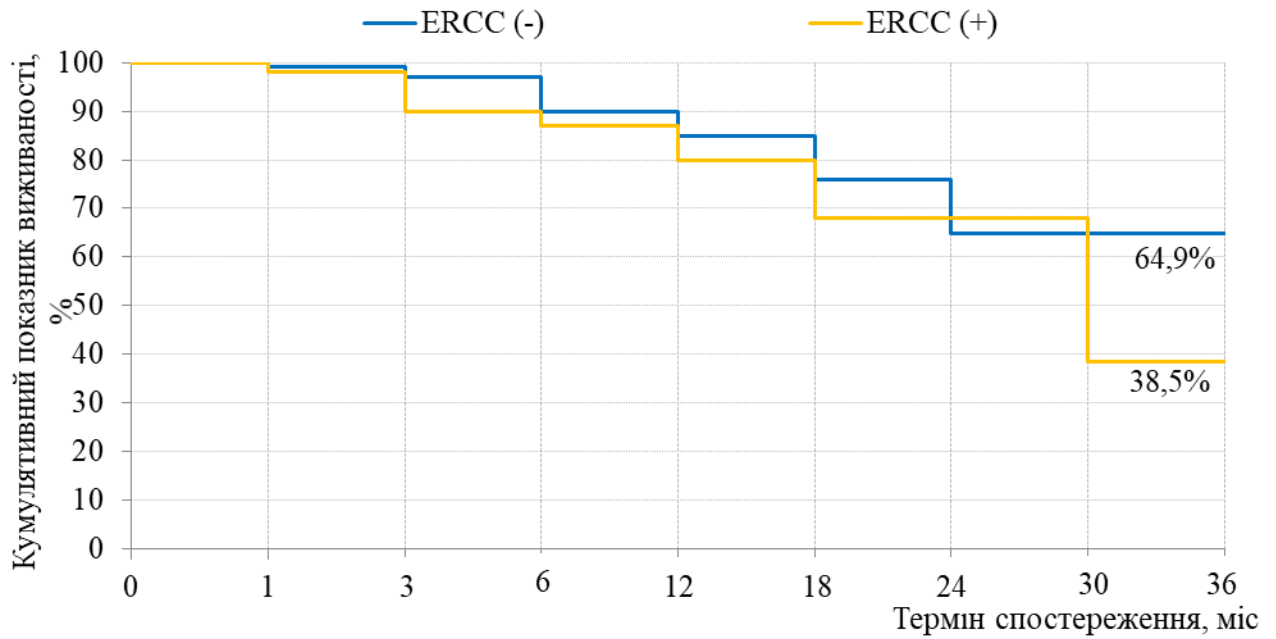


(a)

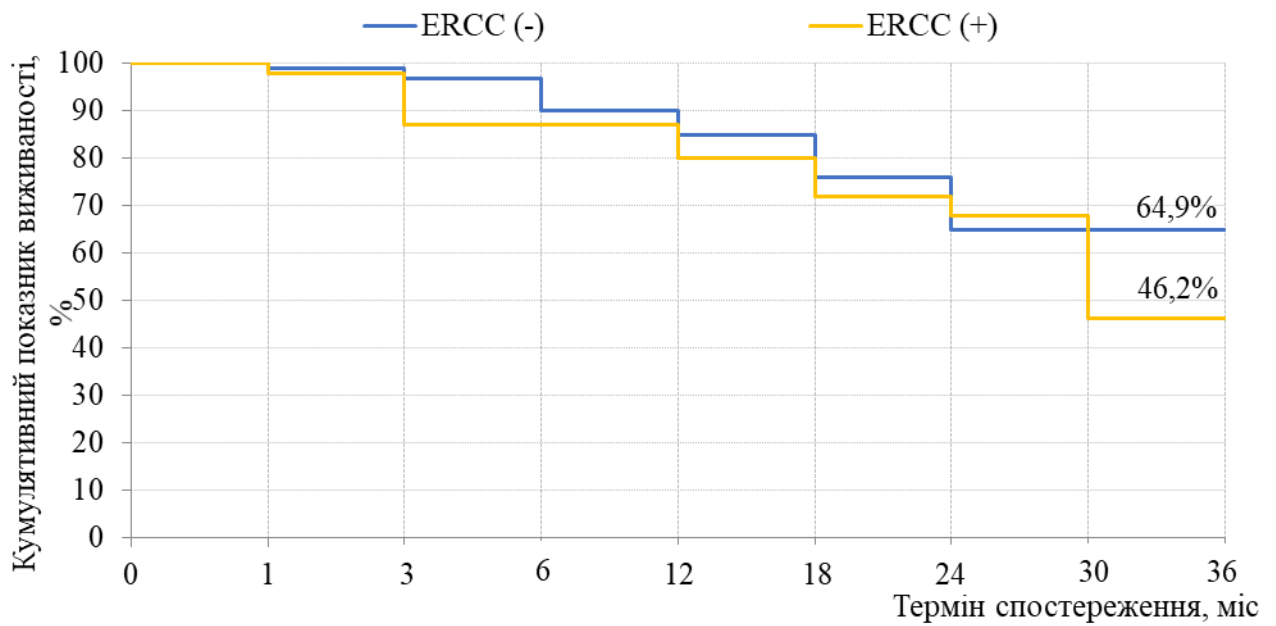


(б)

Рис. 3.7 Актварні криві за Капланом-Майера в залежності наявності експресії Е-кадгерину: (а) – перебіг пухлинного процесу; (б) – загальна виживаність

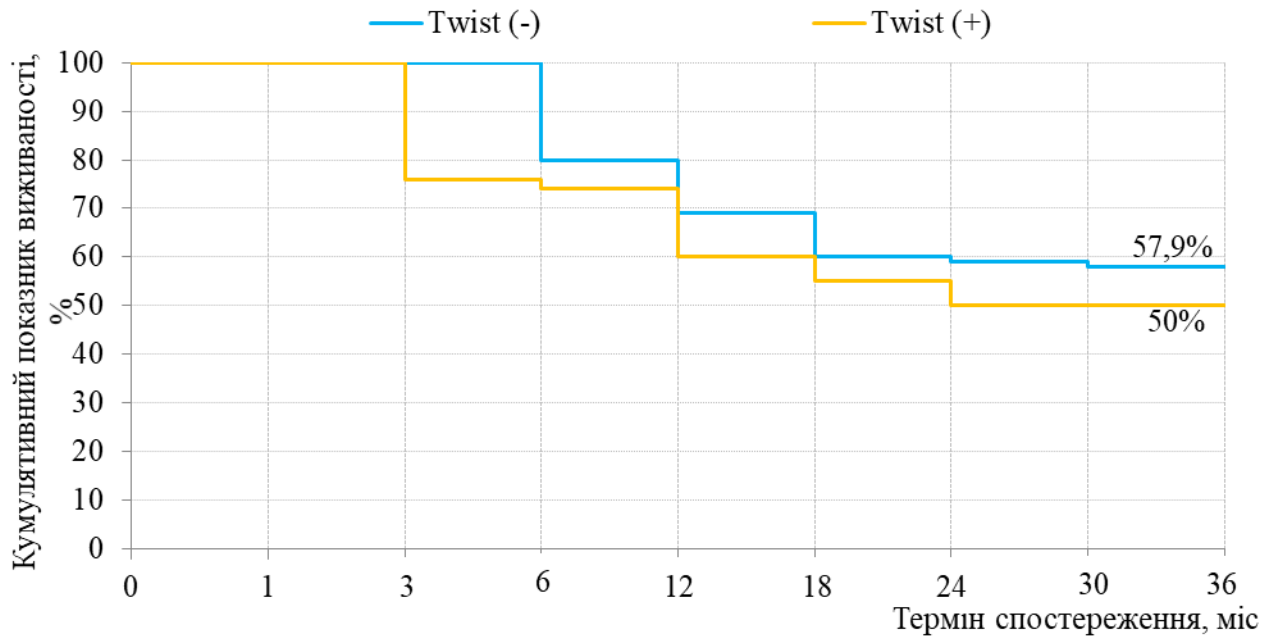


(a)

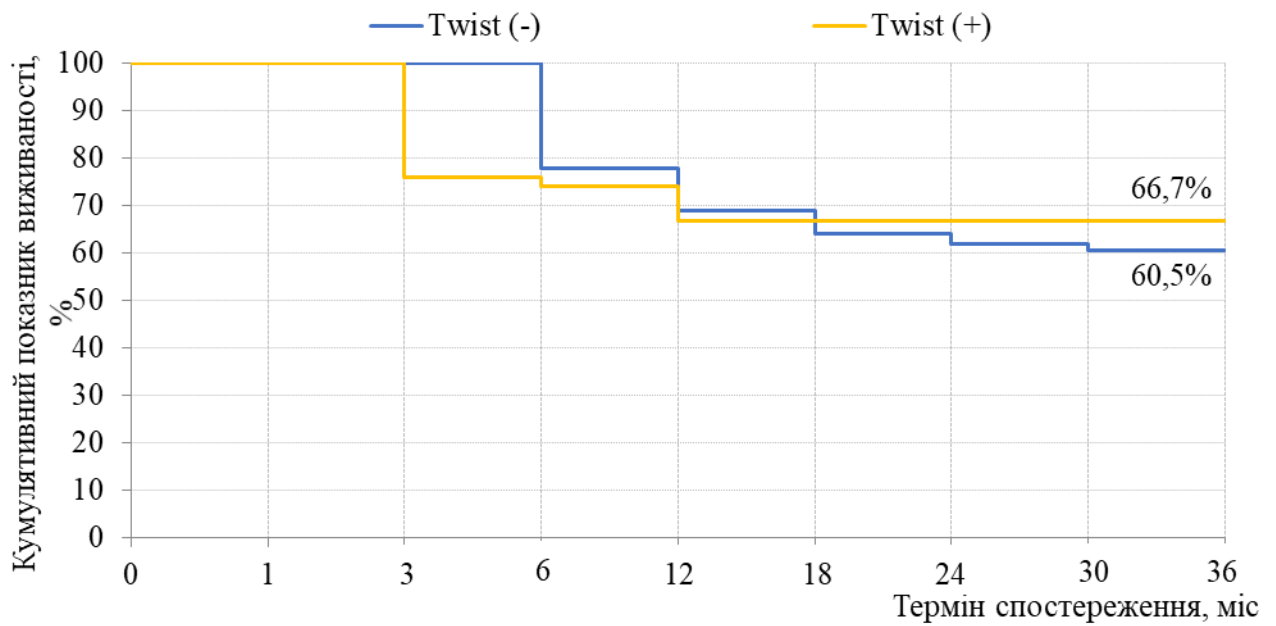


(б)

Рис. 3.8 Актурні криві за Капланом-Майера в залежності наявності експресії ERCC: (а) – перебіг пухлинного процесу; (б) – загальна виживаність

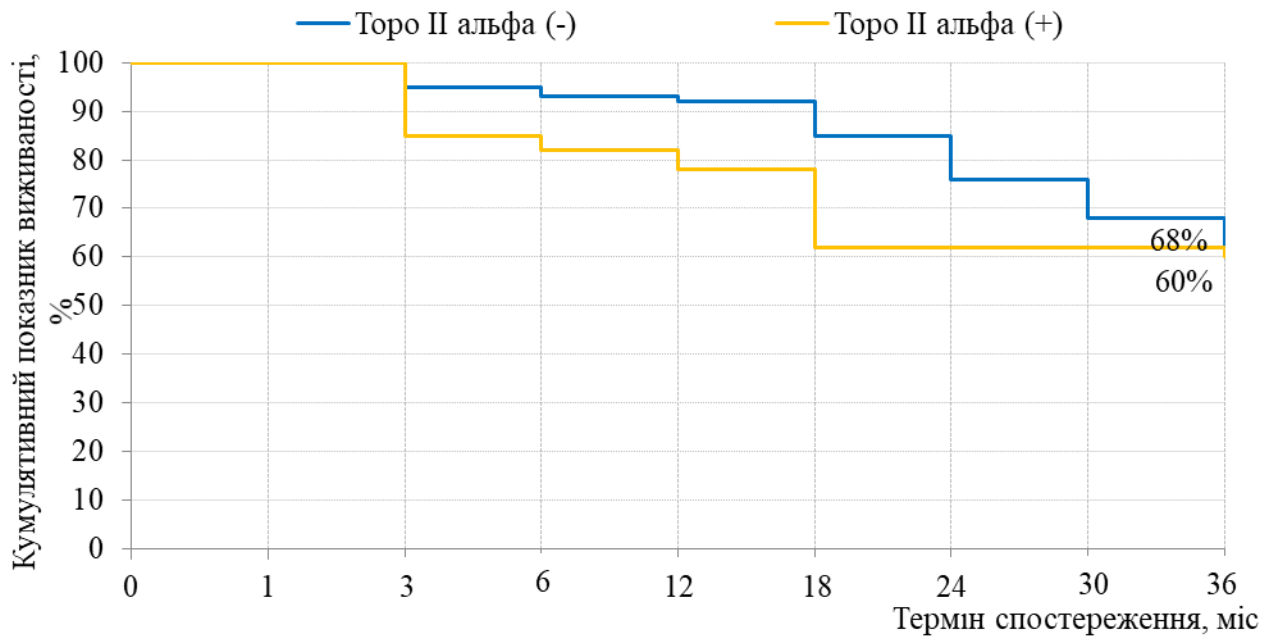


(a)

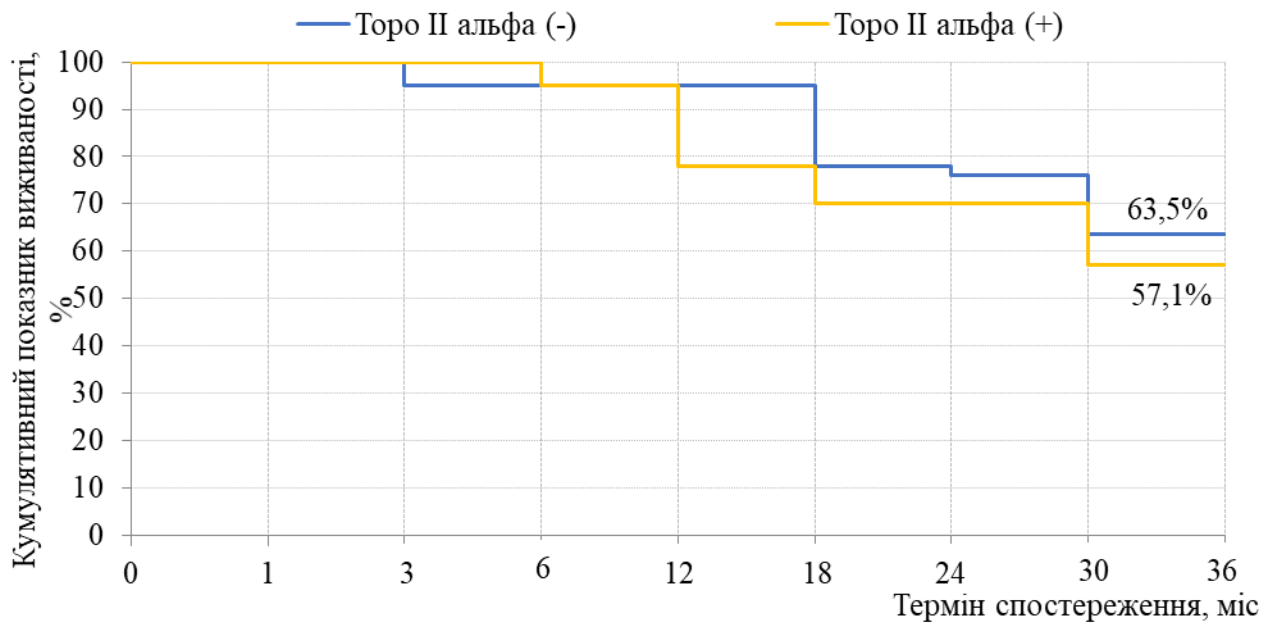


(б)

Рис. 3.9 Актурні криві за Капланом-Майера в залежності наявності експресії Twist: (а) – перебіг пухлинного процесу; (б) – загальна виживаність



(a)



(б)

Рис. 3.10 Актварні криві за Капланом-Майєра в залежності наявності експресії Торо II альфа: (а) – перебіг пухлинного процесу; (б) – загальна виживаність

3.3. Дослідження комплексів антигенів, що характеризують імунофенотип пухлинної клітини раку прямої кишки

Виходячи з питань, що поставлені в даній роботі, були досліджені наступні комплекси антигенів, що характеризують імунофенотип пухлинної клітини РПК: Е-кадгерин/ERCC1, Е-кадгерин/Торо II- α , Twist/ERCC1, Twist/Торо II- α (табл. 3.30). Такий підхід щодо зв'язку маркерів ЕМП з білками, які асоційованими з лікарською резистентністю ПК, раніше не використовувався, однак згадані «комбінації» антигенів можуть бути досить інформативними та перспективними для прогнозування перебігу пухлинного процесу хворих на РПК за умов їх відповідного лікування. Комплекс Е-кадгерин/Тwist не розглядався, оскільки ці антигени є антагоністами.

В табл. 3.28 наведені результати аналізу перебігу пухлинного процесу хворих на РПК в залежності від характеру експресії маркерів ЕМП та білків, асоційованих з лікарською резистентністю. Для визначення впливу окремих комбінацій антигенів, використано метод оцінки ризиків шляхом розрахунку відношення шансів та довірчого інтервалу. Даний метод – це статистика, яка дозволяє кількісно оцінити силу взаємозв'язку між наявністю антигену та настанням несприятливої події. Кожен варіант фенотипу розглядався окремо, шляхом розділення генеральної сукупності хворих на дві підгрупи (хворі, у яких виявлено окремий комплекс антигенів та хворі, з іншими варіантами комплексів). Використання даного методу виправдано через невелику кількість спостережень в окремих підгрупах, оскільки при розрахунку достовірності взаємозв'язку він оперує в першу чергу ймовірностями настання події.

Таблиця 3.28

Оцінка залежності перебігу пухлинного процесу хворих на РПК від характеру експресії маркерів ЕМП та білків, асоційованих з лікарською резистентністю (ретроспектива).

Фенотип пухлинних клітин (за результатами ІГХ аналізу)	n	ВШ (відношення шансів)	95% ДІ	Знач., p
Е-кадгерин+ / ERCC1+	6	1,025	0,785 – 1,866	0,526
Е-кадгерин- / ERCC1+	15	1,802	1,586 – 3,258	0,001*
Е-кадгерин+ / ERCC1-	8	0,757	0,356 – 0,958	0,012*
Е-кадгерин- / ERCC1-	21	1,232	1,002 – 2,357	0,001*
Е-кадгерин+ / Торо II-α+	4	0,801	0,589 – 1,258	0,336
Е-кадгерин+ / Торо II-α-	18	1,11	0,693 – 1,317	0,159
Е-кадгерин- / Торо II-α+	8	1,789	1,168 – 2,871	0,001*
Е-кадгерин- / Торо II-α-	20	1,235	0,873 – 1,328	0,321
Twist+ / Торо II-α+	2	н/д	н/д	н/д
Twist+ / Торо II-α-	10	1,13	0,857 – 1,336	0,142
Twist- / Торо II-α+	10	0,941	0,133 – 0,989	0,006*
Twist- / Торо II-α-	28	1,541	0,741 – 2,521	0,356
Twist+ / ERCC1+	6	1,102	0,985 – 1,638	0,369
Twist+ / ERCC1-	6	1,133	0,873 – 1,299	0,345
Twist- / ERCC1+	7	1,191	0,899 – 1,369	0,634
Twist- / ERCC1-	31	1,022	0,579 – 1,355	0,841

Примітка: * - різниця статистично значима на рівні $p=0,0$

За отриманими даними достовірно інформативними показниками аналізу тривалості без продовження хвороби є наступні комбінації антигенів: Е-кадгерин/ERCC1, Е-кадгерин/Торо II-α, Twist/Торо II-α

Після отримання результатів щодо інформативності запропонованих комплексів маркерів було оцінено зв'язок позитивної експресії досліджених антигенів (Е-кадгерина, ERCC1, Twist та Торо II- α) із загальною виживаністю хворих на РПК. Результати даного дослідження наведені в табл. 3.29.

Таблиця 3.29

Оцінка залежності загальної виживаності хворих на РПК від характеру експресії маркерів ЕМП та білків, асоційованих з лікарською резистентністю

Фенотип пухлинних клітин (за результатами ІГХ аналізу)	n	ВШ (відношення шансів)	95% ДІ	Знач., p
Е-кадгерин+ / ERCC1+	6	1,158	1,023 – 1,856	0,028*
Е-кадгерин+ / ERCC1-	8	0,569	0,358 – 0,856	0,001*
Е-кадгерин- / ERCC1+	15	1,253	1,003 – 2,325	0,038*
Е-кадгерин- / ERCC1-	21	1,012	0,658 – 1,328	0,325
Е-кадгерин+ / Торо II- α +	4	1,233	1,025 – 2,253	0,001*
Е-кадгерин+ / Торо II- α -	18	0,856	0,352 – 0,968	0,002*
Е-кадгерин- / Торо II- α +	8	1,023	0,621 - 1,253	0,110
Е-кадгерин- / Торо II- α -	20	0,968	0,755 - 1,189	0,220
Twist+ / Торо II- α +	2	нд	нд	Нд
Twist+ / Торо II- α -	10	0,856	0,551 - 1,145	0,248
Twist- / Торо II- α +	10	1,036	0,518 - 1,259	0,280
Twist- / Торо II- α -	28	0,988	0,693 - 1,201	0,170
Twist+ / ERCC1+	6	1,058	0,786 - 1,156	0,117
Twist+ / ERCC1-	6	0,869	0,671 - 1,271	0,107
Twist- / ERCC1+	7	1,113	1,008 – 1,356	0,048*
Twist- / ERCC1-	31	0,969	0,642 - 1,091	0,283

Примітка: * - різниця статистично значима на рівні $p=0,05$

В табл. 3.30-3.33 наведені результати аналізу тривалості періоду виживаності в залежності від експресії маркерів.

Таблиця 3.30

Загальна 3-річна виживаність хворих на РПК з урахуванням статусу експресії Е-кадгерину та ERCC1 у пухлинних клітинах хворих ретроспективної групи (n=50)

Фенотип пухлинних клітин	Частка померлих за 3 роки		Тривалість життя, міс.
	n	%	
Е-кадгерин ⁺ /ERCC1 ⁺ , n=6	4	67,0	15±2,3
Е-кадгерин ⁺ /ERCC1 ⁻ , n=8	0	0	-
Е-кадгерин ⁻ /ERCC1 ⁺ , n=15	8	53,3	18,3±4,2
Е-кадгерин ⁻ /ERCC1 ⁻ , n=21	9	42,9	25±8,3

Примітка: $\chi^2=24,211$, $p=0,001$

Таблиця 3.31

Загальна 3-річна виживаність хворих на РПК з урахуванням статусу експресії Е-кадгерину та Торо Па у пухлинних клітинах хворих ретроспективної групи (n=50)

Фенотип пухлинних клітин	Частка померлих за 3 роки		Тривалість життя, міс.
	n	%	
Е-кадгерин ⁺ /Торо Па ⁺ , n=4	3	75,0	13,1±1,8
Е-кадгерин ⁺ /Торо Па ⁻ , n=18	3	16,6	18,1±3,1
Е-кадгерин ⁻ /Торо Па ⁺ , n=8	4	50,0	27,2±7,1
Е-кадгерин ⁻ /Торо Па ⁻ , n=20	9	45,0	22,3±4,9

Примітка: $\chi^2=21,099$, $p=0,011$

Таблиця 3.32

Результати аналізу тривалості періоду виживаності в залежності від експресії Топо II-а та Twist

Варіанти експресії маркерів	Частка померлих за 3 роки, %	Тривалість життя, міс.
Twist+Топо II- α +	50 (n=1)	17,7
Twist+Топо II- α -	33 (n= 3)	23,3 $\pm$ 7,3
Twist-Топо II- α +	50 (n=5)	20,4 $\pm$ 9,8
Twist-Топо II- α -	42,8 (n=12)	21,9 $\pm$ 10,1

Примітка: $\chi^2=23,625$, $p=0,001$

Таблиця 3.33

Результати аналізу тривалості періоду виживаності в залежності від експресії Twist та ERCC1

Варіанти експресії маркерів	Частка померлих за 3 роки, %	Тривалість життя, міс.
Twist+ERCC1+	50 (n=3)	14,9 $\pm$ 6,5
Twist+ERCC1-	30 (n=2)	36,2 $\pm$ 11,2
Twist-ERCC1+	57 (n=4)	22,2 $\pm$ 8,9
Twist-ERCC1-	35,4 (n=11)	20,9 $\pm$ 9,6

Примітка: $\chi^2=21,663$, $p=0,001$

За умов наявності ПК з фенотипом Е-кадгерин⁻/ERCC1⁺ прогноз перебігу захворювання погіршується, прослідковується достовірно ($p<0,05$) зменшення частоти випадків без продовження хвороби та зниження показників виживаності.

Актуарні криві перебігу загальної виживаності хворих на рак прямої кишки за Капланом-Майера в залежності від варіанту оцінки поєднання антигенів представлені нижче. Рис. 3.11 - 3.14.

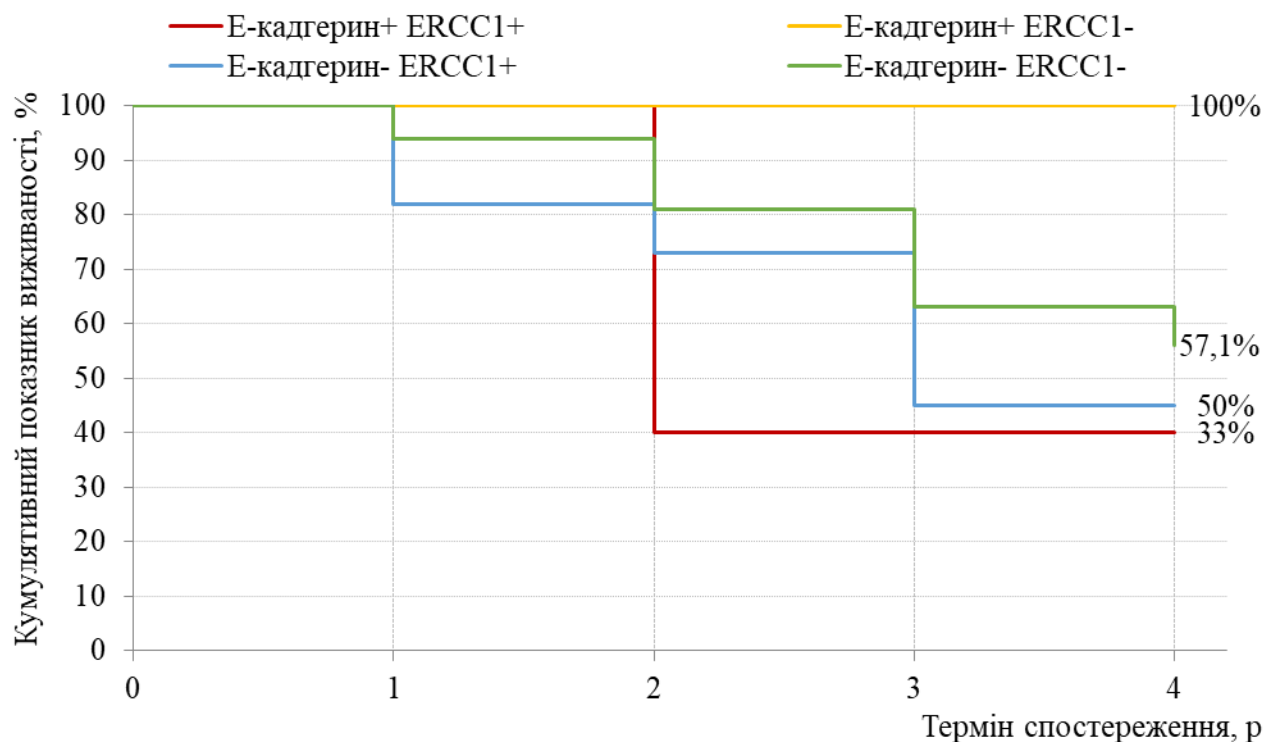


Рис. 3.11. Криві перебігу пухлинного процесу хворих на колоректальний рак за Капланом-Майером залежно від експресії Е-кадгерин та ERCC1.

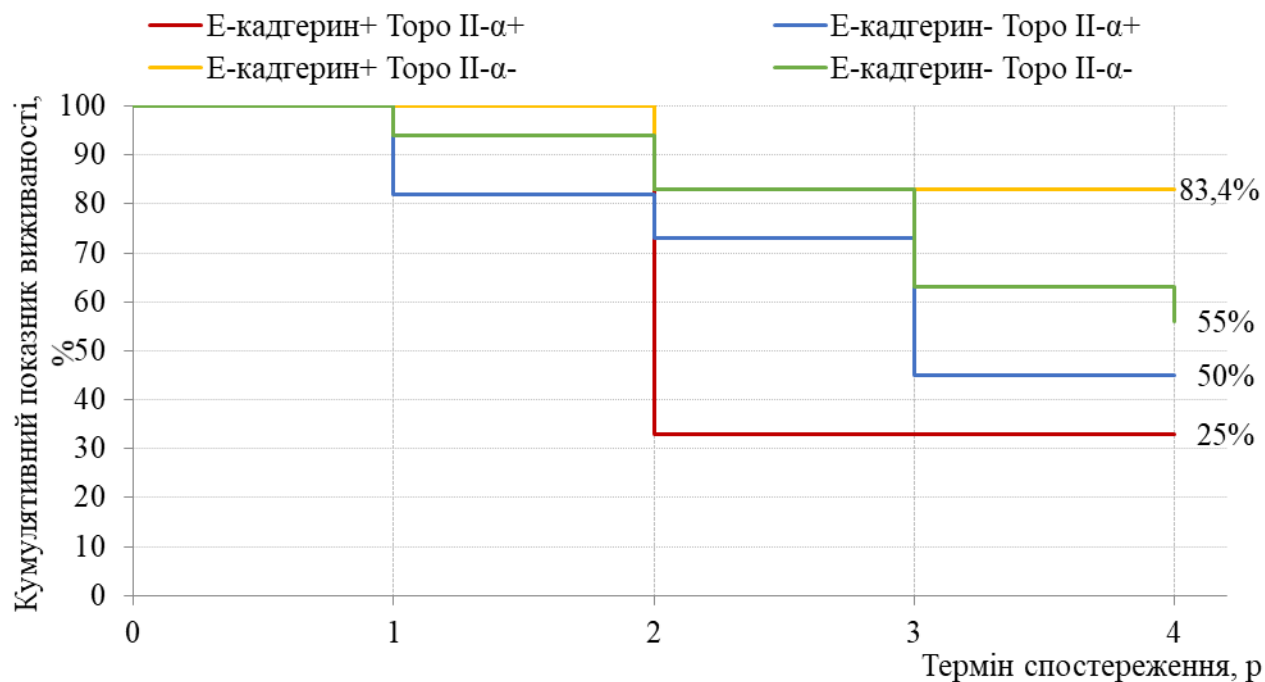


Рис. 3.12. Криві перебігу пухлинного процесу хворих на рак прямої кишки за Капланом-Майером залежно від від експресії Е-кадгерин та Торо II- α .

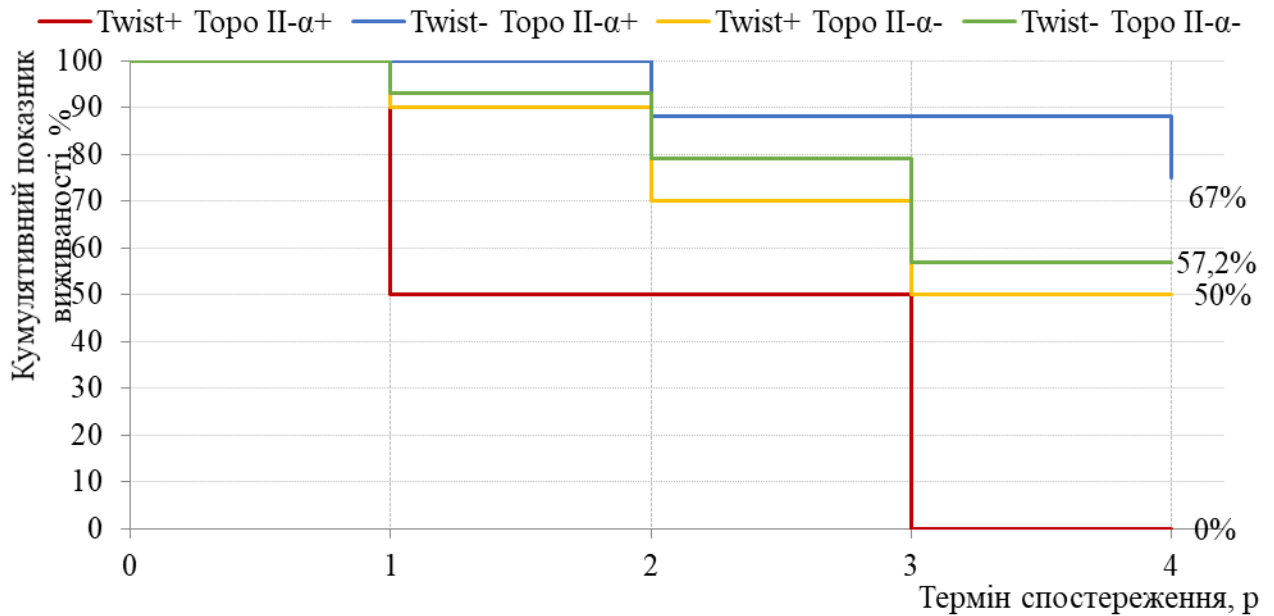


Рис. 3.13. Криві перебігу пухлинного процесу хворих на рак прямої кишки за Капланом-Майером залежно від від експресії Twist та Торо II- α .

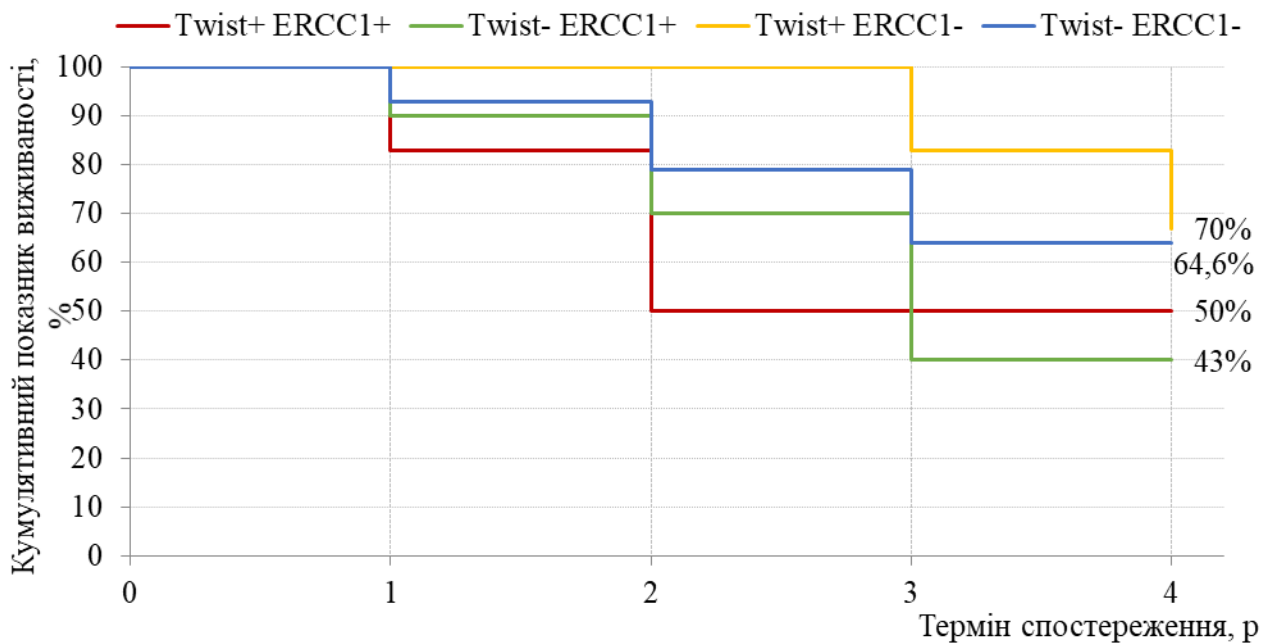


Рис. 3.14. Криві перебігу пухлинного процесу хворих на рак прямої кишки за Капланом-Майером залежно від експресії Twist та ERCC1.

Підсумовуючи дані ретроспективного аналізу, можна зробити висновок, що для прогнозування ефективності проведення у хворих на РПК платиновмісних схем ПХТ, потрібна оцінка ПК як мінімум за трьома маркерами – показниками: E-cadherin, ERCC1 та Торо II- α . При цьому встановлено цікавий факт, що детекція антигенів ERCC1 та Торо II- α (в комплексному або монорежимі) у великій кількості клітин суттєво зменшує відсоток пацієнтів періоді без продовження хвороби та погіршує загальну виживаність при застосуванні стандартного підходу до лікування хворих на РПК платиновмісними схемами. Тобто, можна зробити висновок, що у хворих з фенотипом ПК Торо II- α^+ та ERCC1 $^+$ ефективність використання оксаліплатину в терапевтичних схемах значно знижується і застосування таких схем виявляється недостатньо аргументованим. Протилежна тенденція спостерігається для маркеру E-cadherin. Наявність даного антигену в клітинах пухлини збільшує ймовірність сприятливого перебігу захворювання. Застосування додаткових характеристик антигенного профілю ПК, зокрема маркерів процесу ЕМП, прямо впливає на прогностичну оцінку перебігу пухлинного процесу в т.ч. за умов проведення ПХТ.

Таким чином, встановлено, що достовірно інформативними показниками прогнозування тривалості безрецидивного періоду та загальної виживаності хворих в умовах хіміотерапії є наступні фенотипові антигенні комплекси: Е-кадгерин- / ERCC1 $^+$, Е-кадгерин $^+$ / ERCC1 $^-$, Е-кадгерин- / ERCC1 $^-$, Е-кадгерин- / Торо II- α^+ . При цьому, антигенні комплекси в пухлинних клітинах Е-кадгерин $^-$ /ERCC1 $^+$ та Е-кадгерин $^-$ /Торо II- α^+ асоційовані з погіршенням прогнозу перебігу захворювання із зменшенням частоти і його тривалості випадків безрецидивного періоду та зниження загальної виживаності.

За результатами аналізу зв'язку експресії окремих антигенів із загальною виживаністю при РПК встановлено, що тільки наявність Е-кадгерин $^+$ клітин в пухлинному матеріалі свідчить про позитивний прогноз щодо характеру

перебігу пухлинного процесу та виживаності пацієнтів, тоді як експресія в ПК антигенів Торо II-α та ERCC1 достовірно погіршує його.

Нами доказано, що застосування одночасного визначення експресії маркерів ЕМП пухлинних клітин та білків Е-кадгерин, Торо II-α та ERCC1 є інформативним та ефективним комплексом для визначення тактики лікування та прогнозування перебігу пухлинного процесу у хворих на РПК.

3.4. Визначення групи підвищеного ризику на основі рівня експресії маркерів пухлинних клітин

Для визначення рівня експресії даних маркерів, які є граничними для віднесення пацієнтів до групи підвищеного ризику застосовано ROC-аналіз [167]. Даний метод дозволяє шляхом варіації значення рівня експресії маркеру, визначати долю вірного віднесення хворого до однієї з двох досліджуваних груп. У випадку аналізу ризику прогресії захворювання, такими групами виступають хворі з ремісією та прогресією пухлинного процесу. Оптимальний поріг та його діагностична цінність визначається шляхом розрахунку показників чутливості та специфічності, а також площі під ROC-кривою.

Площа під ROC-кривою (Area Under Curve, AUC) є характеристикою якості класифікації при розрахованому порозі. Чим більше значення AUC, тим «краще» розрахована границя розділяє хворих з ремісією та прогресією пухлинного процесу.

Показники чутливості та специфічності є показниками діагностичної ефективності визначеного рівня експресії. Чутливість визначає долю хворих, у яких була вірно визначено відсутність негативного перебігу пухлинного процесу, а той час як специфічність свідчить про долю вірно класифікованих хворих з прогресом захворювання. Таб.3.34

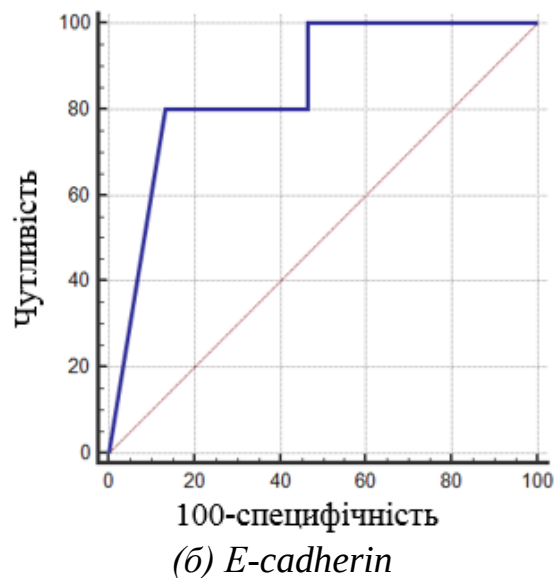
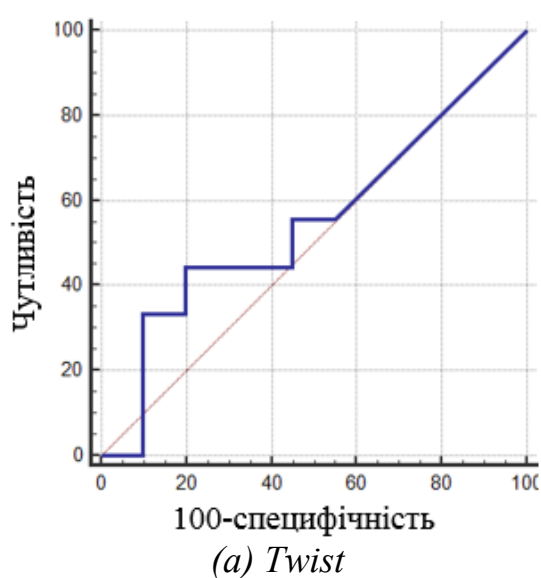
Таблиця 3.34

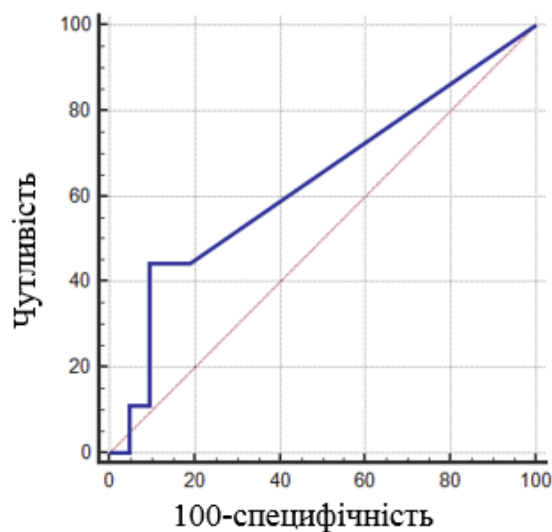
**Визначення рівня експресії маркерів для оцінки підвищення ризику
виникнення прогресії захворювання**

Маркер	Розрахований рівень експресії	Площадь під ROC кривою (AUC)	Чутливість	Специфічність	Значимість, p
Twist	>94	0,550	44,44	80,00	0,683
Е-кадгерин	≤10	0,853	80,00	86,67	0,001*
ERCC1	>12	0,942	88,89	100,00	<0,001*
Торо Па	>10	0,632	44,44	90,48	0,190

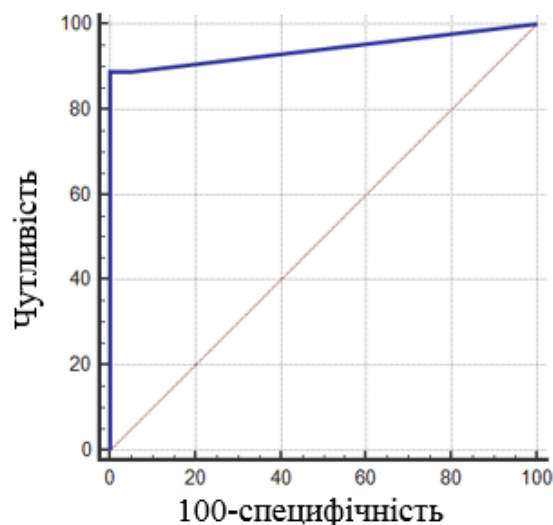
*статистично значимі маркери

Відповідні ROC-криві для аналізу ризику виникнення прогресії захворювання зображені на рис. 3.15.





(в) Торо IIa



(г) ERCC1

Рис. 3.15. ROC-криві визначення рівня експресії антигенних маркерів та білків, що свідчать про підвищений ризик виникнення прогресії захворювання

Результати ROC-аналізу підтвердили результати аналізу, що свідчили про прогностичну цінність маркерів Е-кадгерин та ERCC1 при прогнозуванні перебігу пухлинного процесу. У відповідності до визначеного рівня експресії даних маркерів, всіх пацієнтів ретроспективної групи було розділено на три підгрупи низького ($n=15$ (30%)), підвищеного ($n=27$ (54%)) та високого ($n=8$ (16%)) ризику. Діагностична ефективність даного розділення оцінювалась за критерієм Фішера (табл. 3.35) та актуарними кривими (рис. 3.16).

Таблиця 3.35

Оцінка діагностичної ефективності визначених рівнів експресії маркерів (ретроспектива)

Група	Комбінація антигенів	Ремісія ($n=30$)	Прогресія ($n=20$)
Низького ризику	E-cadherin ⁺ / ERCC1 ⁻	15 (100%)	0 (0%)
Підвищеного ризику	E-cadherin ⁺ / ERCC1 ⁺	14 (51,9%)	13 (48,1%)
	E-cadherin ⁻ / ERCC1 ⁻		
Високого ризику	E-cadherin ⁻ / ERCC1 ⁺	1 (12,5%)	7 (87,5%)

*статистично значима різниця $p<0,001$

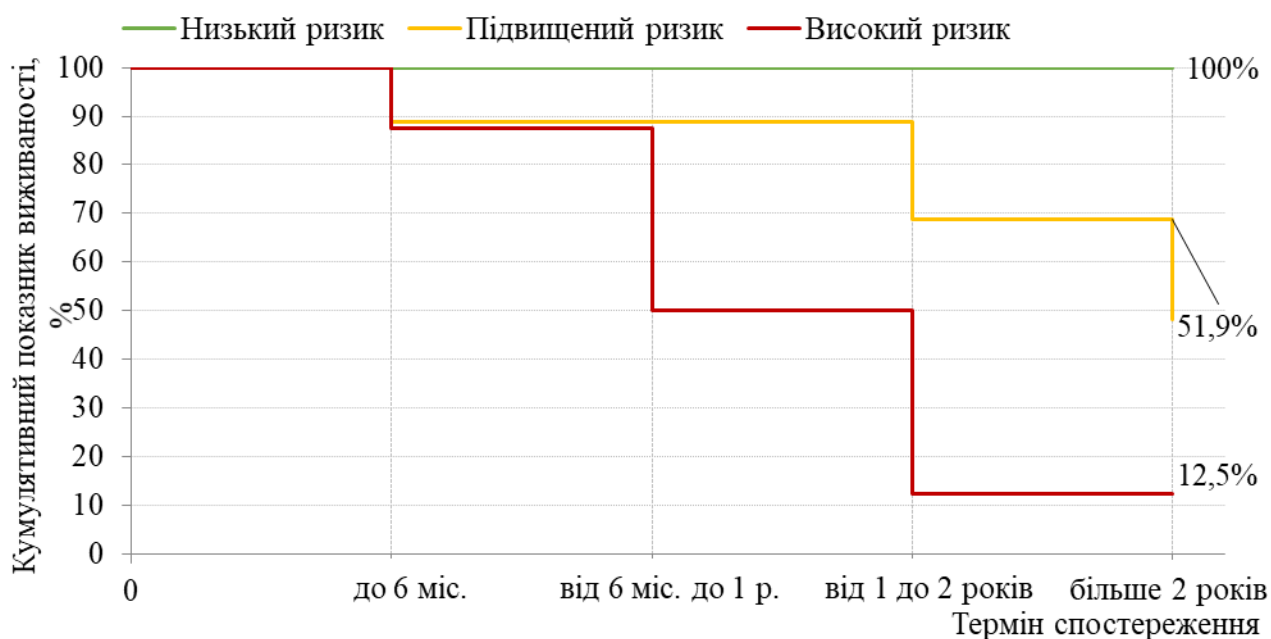


Рис. 3.16. АктUARНІ криві аналізу перебігу захворювання в 3 - підгрупах

Результати свідчать про високу ефективність маркерів E-кадгерин та ERCC1 при прогнозуванні прогресу пухлинного процесу.

Аналогічним методом були розраховані значення рівня експресії в залежності від виживаності (табл. 3.36).

Таблиця 3.36

Визначення рівня експресії маркерів, що свідчать про підвищений ризик летального наслідку

Маркер	Розрахований рівень експресії	Площа під ROC кривою (AUC)	Чутливість	Специфічність	Значимість, p
Twist	>31	0,506	55,56	55,00	0,961
E-cadherin	≤10	0,833	76,67	85,71	0,002*
ERCC1	>12	0,750	100,00	74,29	0,026*
Топо IIα	>10	0,720	75,56	95,24	0,028*

*статистично значимі маркери

Відповідні ROC-криві для аналізу ризику летальних випадків зображені на рис. 3.17.

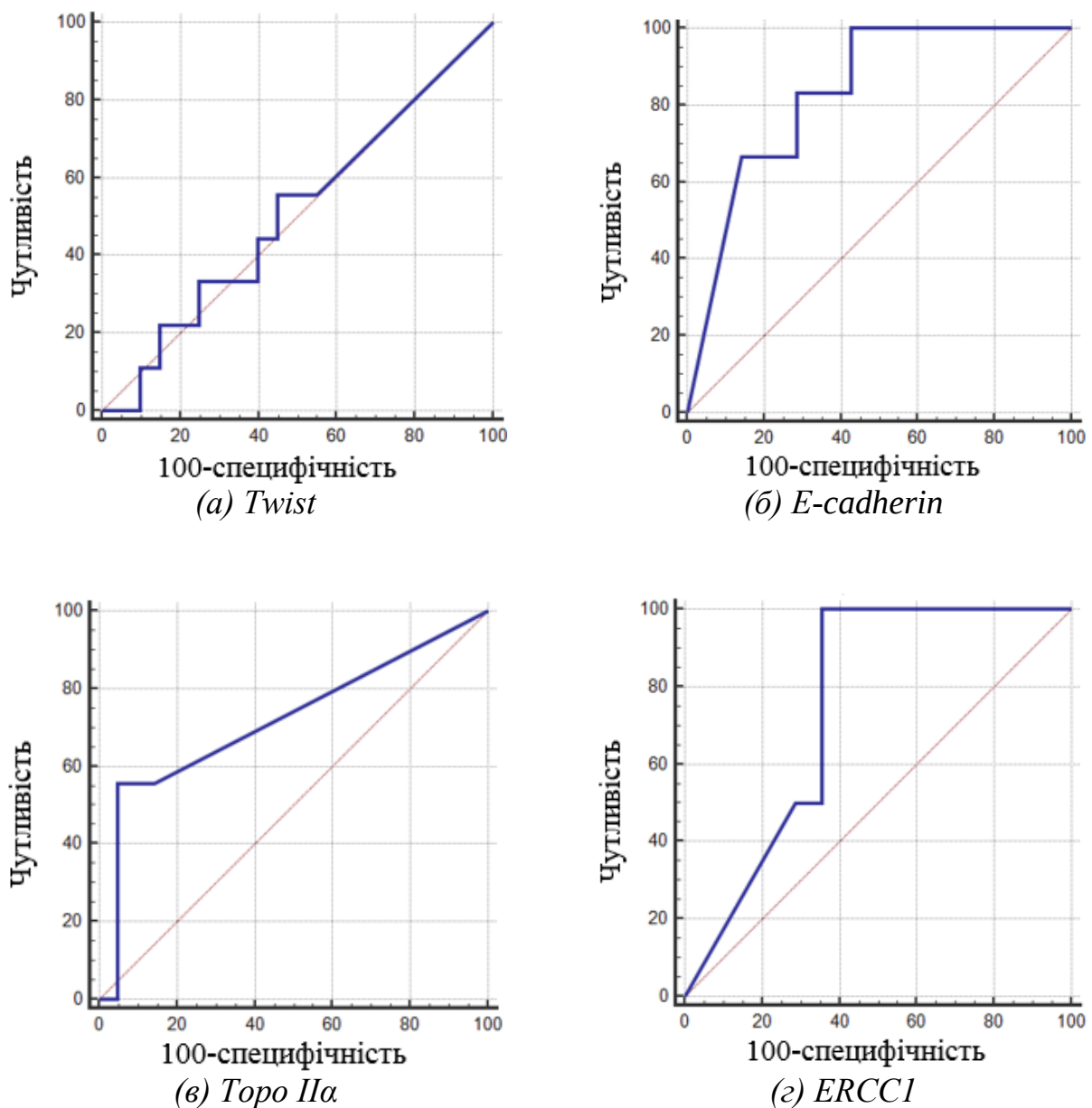


Рис. 3.17. ROC-криві визначення рівня експресії антигенних маркерів та білків, що свідчать про підвищений ризик летального випадку

За результатами ROC-аналізу визначено, що при прогнозуванні виживаності найбільш ефективними виявились маркери Е-кадгерин, ERCC1, Торо IIa.

В залежності від рівня експресії трьох маркерів (E-cadherin, ERCC1, Торо IIa) пацієнти ретроспективної групи (n=50) були розподілені на три підгрупи ризику. В підгрупу низького ризику увійшли 15 (30%) хворих, у яких значення

всіх показників не покидали меж розрахованих за допомогою ROC-аналізу. До групи підвищеного ризику були включені 24 (48%) пацієнтів, у котрих рівень експресії одного з трьох маркерів перевищував визначені межі. Відповідно, до групи високого ризику віднесені 11 (22%) хворих у яких рівень експресії маркерів покидав встановлені межі у двох або трьох випадках.

Діагностична ефективність даного розділення оцінювалась за критерієм Фішера (табл. 3.37) та актуарними кривими (рис. 3.18).

Таблиця 3.37

Оцінка діагностичної ефективності визначених рівнів експресії маркерів

Група	Комбінація антигенів	ремісія (n=30)	прогресія (n=20)
Низького ризику	E-cadherin ⁺ ERCC1 ⁻ Топо IIα ⁻	13 (86,7%)	2 (13,3%)
Підвищеного ризику	E-cadherin ⁻ ERCC1 ⁻ Топо IIα ⁻	14 (58,3%)	10 (41,7%)
	E-cadherin ⁺ ERCC1 ⁻ Топо IIα ⁺		
Високого ризику	E-cadherin ⁺ ERCC1 ⁺ Топо IIα ⁻	3 (27,3%)	8 (72,7%)
	E-cadherin ⁻ ERCC1 ⁺ Топо IIα ⁺		
	E-cadherin ⁺ ERCC1 ⁻ Топо IIα ⁺		
	E-cadherin ⁺ ERCC1 ⁺ Топо IIα ⁺		

*статистично значима різниця p<0,001

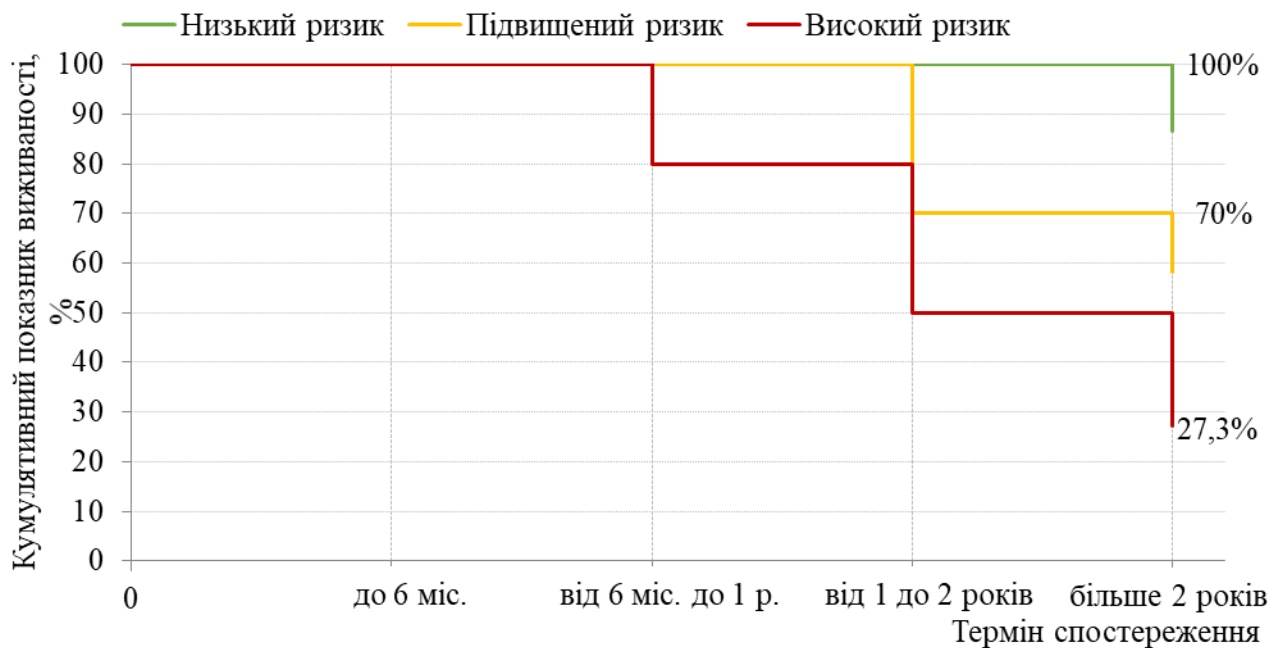


Рис. 3.18. АктUARНІ криві аналізу виживаності в групах

Результати свідчать про високу ефективність маркерів E-кадгерин, ERCC1 та Торо II α при прогнозуванні загальної виживаності.

Додатково, для отримання кількісної міри ризику виникнення прогресу пухлинного процесу та/або летального наслідку застосовано метод побудови математичних прогностичних моделей – логістичний регресійний аналіз [168].

Логістична модель має вигляд:

$p = \frac{1}{1+e^{-y}}$, де p – розрахована ймовірність настання деякої події (в нашому випадку настання прогресу або смерть хворого), e – основа натуральних логарифмів 2,713, y – стандартне рівняння регресії.

Моделювання прогностичної моделі для визначення ймовірності настання прогресії захворювання дозволило отримати модель виду:

$$p = \frac{1}{1+e^{-y}},$$

де $y = -E\text{-cadherin} \cdot 0,003 + ERCC1 \cdot 0,231 - 3,227$

Якість моделі оцінювалась за показниками функції подібності, за результатами якої розраховані значення показника хі-квадрат (27,193, $p=0,001$). Аналіз прогностичної можливості побудованої моделі дозволив отримати показники чутливості 0,997 та специфічності 0,889, загальний процент правильно класифікованих значень – 96,7%.

Моделювання прогностичної моделі для визначення ймовірності настання прогресії захворювання дозволило отримати модель виду:

$$p = \frac{1}{1+e^{-y}},$$

де $y = -E\text{-кадгерин} * 0,009 + ERCC1 * 0,035 + \text{Торо II} \alpha * 0,128 - 1,635$

Якість моделі оцінювалась за показниками функції подібності, за результатами якої розраховані значення показника хі-квадрат (16,395, $p=0,001$).

Аналіз прогностичної можливості побудованої моделі дозволив отримати показники чутливості 0,953 та специфічності 0,833, загальний процент правильно класифікованих значень – 95,0%.

Підсумок.

За результатами кореляційного аналізу зв'язку експресії окремих антигенів із загальною виживаністю при РПК встановлено, що тільки наявність Е-кадгерин⁺ клітин в пухлинному матеріалі свідчить про позитивний прогноз щодо характеру перебігу пухлинного процесу та виживаності пацієнтів, тоді як експресія в ПК антигенів Торо II- α та ERCC1 достовірно погіршує його.

Встановлено, що достовірно інформативними показниками прогнозування тривалості безрецидивного періоду та загальної виживаності хворих в умовах хіміотерапії є наступні фенотипові антигенні комплекси: Е-кадгерин⁺/ERCC1⁻, Е-кадгерин⁺/Торо II- α ⁻, Twist⁻/Торо II- α ⁻. В свою чергу, антигенні комплекси в пухлинних клітинах Е-кадгерин⁻/ERCC1⁺ та Е-кадгерин⁻/Торо II- α ⁺ асоційовані з погіршенням прогнозу перебігу захворювання із зменшенням частоти і його тривалості випадків безрецидивного періоду та зниження загальної виживаності.

Показано, що застосування одночасного визначення експресії маркерів ЕМП пухлинних клітин та білків Торо II-α та ERCC1 є інформативним та ефективним комплексом при прогнозуванні перебігу пухлинного процесу у хворих на РПК. Аналіз прогностичної можливості побудованої моделі дозволив отримати показники чутливості 0,997/0,953 та специфічності 0,889/0,833, загальний процент правильно класифікованих значень – 96,7%/95,0%.

Основні положення даного розділу висвітлені у наступних публікаціях [169 -172].

РОЗДІЛ 4.

ПОРІВНЯЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ІНДИВІДУАЛІЗОВАНИХ І СТАНДАРТНИХ СХЕМ ХІМІОТЕРАПІЇ У ХВОРИХ НА РАК ПРЯМОЇ КИШКИ

4.1. Індивідуалізація лікування хворих на рак прямої кишки шляхом застосування схем поліхіміотерапії із врахуванням експресії молекулярно-біологічних маркерів лікарської резистентності

На сьогоднішній день продовжує спостерігатися зростання захворюваності на РПК, що є гетерогенним захворюванням як за агресивністю перебігу пухлинного процесу, так і за відповіддю на хіміотерапевтичні впливи. Саме гетерогенність РПК і змушує шукати можливі варіанти визначення загальних груп пухлин зі схожими ознаками лікарської стійкості. Незважаючи на те, що спостерігається значне збільшення кількості протипухлинних препаратів і їх включення в схеми лікування хворих на РПК, медіана виживаності хворих залишається на рівні 18 - 24 місяців. Варто відзначити той факт, що виживаність хворих з дисемінованими формами РПК залишається головним показником якості їх лікування. Вибір схем лікування хворих на РПК ґрунтується на клінічних рекомендаціях, запропонованих доказовою медициною, що несе в собі істотний недолік - відсутність обліку індивідуальних особливостей організму і характеристики пухлини, а це, в свою чергу, знижує очікуваний ефект від ПХТ.

У дане дослідження включено (за інформованої згоди пацієнта) клінічні дані 53 пацієнтів проспективної групи та 32 хворих контрольної групи з первинним РПК T₁₋₄N₀₋₂M₀. Таб.4.1.

Аналіз пацієнтів обох груп, аналогічно аналізу ретроспективної групи проводився шляхом вивчення документації історій хвороб та карт амбулаторного спостереження хворих.

Середній вік пацієнтів проспективної групи становив $56,2 \pm 24,6$ років (від 32 до 80 років). Серед хворих було 25 жінок (47%) і 28 чоловіків (53%).

Таблиця 4.1.

Клініко-морфологічна характеристика хворих на РПК проспективної групи

Характеристика хворих		Кількість хворих
Стать	чоловіки	28 (53%)
	жінки	25 (47%)
Середній вік		56,2 ± 24,6
<i>Локалізація пухлинного процесу в прямій кишці:</i>		
Верхньоампулярний відділ		29 (54,7%)
Середньоампулярний		5 (9,4%)
Нижньоампулярний		19 (35,9%)
<i>Гістологічна структура пухлини:</i>		
Високодиференційована аденокарцинома		18 (34,0%)
Середньодиференційована аденокарцинома		25 (47,2%)
Низькодиференційована аденокарцинома		10 (18,8%)
<i>Стадія захворювання:</i>		
I	T ₂ N ₀ M ₀	1 (1,9%)
II-A	T ₃ N ₀ M ₀	28 (52,8%)
II-B	T ₄ N ₀ M ₀	4 (7,5%)
III-A	T ₁ N ₁ M ₀	4 (7,5%)
	T ₂ N ₁ M ₀	6 (11,3%)
	T ₂ N ₂ M ₀	2 (3,8%)
III-B	T ₃ N ₁ M ₀	6 (11,3%)
	T ₃ N ₂ M ₀	2 (3,8%)
	T ₄ N ₁ M ₀	0 (0%)
	T ₄ N ₂ M ₀	0 (0%)

Гістологічно всі пухлини були верифіковані як аденокарциноми (34,0% низько диференційований рак, 47,2% помірно диференційований, 35% - високо диференційований).

Типи операцій, що проводили зображено на рис. 4.1.

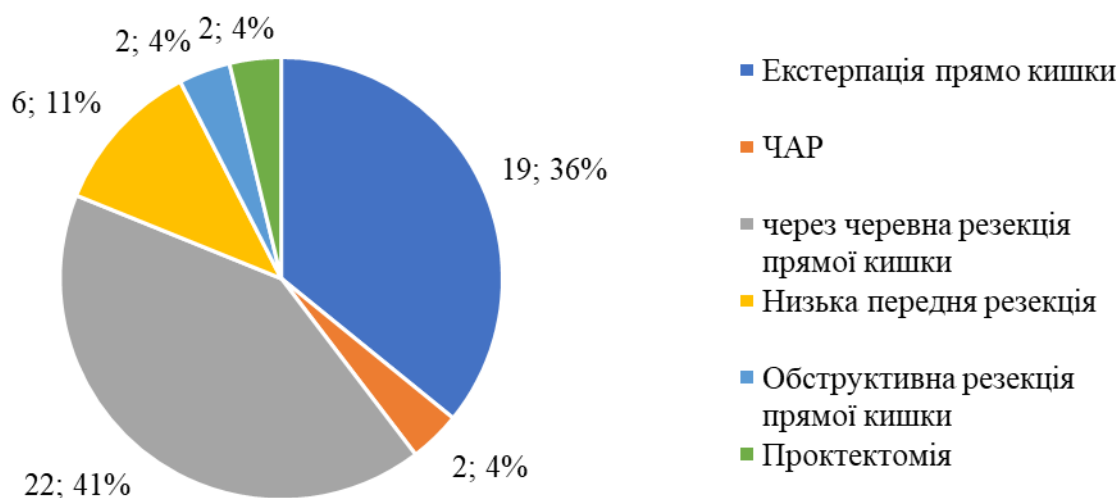


Рис. 4.1. Типи проведених операцій

Всі хворі отримували терапію відповідно до стандартів в період виявлення захворювання за схемою: в неoad'ювантному режимі - курс телегамматерапії, хірургічне лікування рис. 4.1 та в ад'ювантному режимі - проводилася ПХТ за схемою FOLFOX-6 або FOLFIRI.

У всіх пацієнтів проспективної групи був вивчений післяопераційний гістологічний матеріал і встановлена експресія обраних нами білкових маркерів, асоційованих з лікарською резистентністю (ERCC1, Торо IIα) і з ЕМП пухлинних клітин (Е-кадгерин). Згідно з отриманими даними всі пацієнти в проспективному дослідженні були розділені на дві підгрупи :

1. *1 підгрупа* – 30 (57%) пацієнтів були віднесені до групи з прогнозовано високим відсотком позитивної відповіді на проведену платиновмісну схему

ПХТ (FOLFOX-6) з урахуванням переросподілу експресії маркерів згідно (таб. 4.2).

2. 2 підгрупа – 23 (43%) хворих, з іншими комбінаціями біологічних маркерів, які були віднесені до високої групи ризику продовження хвороби. Хворим цієї групи проводилася альтернативна рівноцінна схема FOLFIRI. (Таб.4.2)

Таблиця 4.2

Вибір схеми лікування в залежності від рівня експресії маркерів

Схема лікування	Рівень експресії маркерів
FOLFOX-6 (30 хворих)	Е-кадгерин ⁺ ERCC1 ⁻ Торо II α ⁻ Е-кадгерин ⁻ ERCC1 ⁻ Торо II α ⁻ Е-кадгерин ⁻ ERCC1 ⁺ Торо II α ⁻ Е-кадгерин ⁻ ERCC1 ⁻ Торо II α ⁺
FOLFIRI (23 хворих)	Інші варіації маркерів

Контрольна група пацієнтів складалася з 32 хворих на первинний РПК стадії T₂₋₄N₀₋₂M₀. Середній вік пацієнтів склав 53,8 ± 18,4 року (від 35 до 71 років). Серед хворих було 15 жінок (46%) і 17 чоловіків (54%). Таб.4.3

Таблиця 4.3.

Клініко-морфологічна характеристика хворих на РПК контрольної групи

Характеристика хворих		Кількість хворих
Стать	чоловіки	17 (54%)
	жінки	15 (46%)
Середній вік		53,8 ± 18,4
<i>Локалізація пухлинного процесу в прямій кишці:</i>		
Верхньоампулярний відділ		17 (53,1%)
Середньоампулярний		7 (21,9%)
Нижньоампулярний		8 (25%)
<i>Гістологічна структура пухлини:</i>		
Високодиференційована аденокарцинома		14 (43,7%)
Середньодиференційована аденокарцинома		12 (37,5%)
Низькодиференційована аденокарцинома		6 (18,8%)
<i>Стадія захворювання:</i>		
I	T ₂ N ₀ M ₀	0 (0%)
II-A	T ₃ N ₀ M ₀	16 (50%)
II-B	T ₄ N ₀ M ₀	3 (9,4%)
III-A	T ₁ N ₁ M ₀	1 (3,1%)
	T ₂ N ₁ M ₀	4 (12,5%)
	T ₂ N ₂ M ₀	1 (3,1%)
III-B	T ₃ N ₁ M ₀	6 (18,8%)
	T ₃ N ₂ M ₀	1 (3,1%)
	T ₄ N ₁ M ₀	0 (0%)
	T ₄ N ₂ M ₀	0 (0%)

Гістологічно все пухлини були верифіційованні як аденокарциноми (18,8% низько диференційований рак, 37,5% помірно диференційований, 43,7% - високо диференційований).

У контрольній групі пацієнтів з 32 чоловік контроль маркерів не проводився і всі пацієнти отримали лікування за схемою FOLFOX-6.

Клінічний перебіг на етапі прогресії захворювання хворих проспективної групи суттєво різнився, і залежав від варіанту ад'ювантної поліхіміотерапії.

Після проведеного лікування за допомогою ПХТ в першій підгрупі FOLFOX-6 і другий FOLFIRI спостерігалось наступне. В 1 підгрупі з 30 осіб з прогресією захворювання 4 пацієнта (13,3%). У 2 підгрупі з 23 осіб з прогресією захворювання 14 (60,9%) пацієнтів як показано в таб. 4.4

Сумарно використовуючи вибраний алгоритм підбору схем хіміотерапії з 53 хворих з прогресією 18 (33,9%) та без продовження хвороби 35 (66,1%) пацієнтів як показано в таб. 4.5

Таблиця 4.4

Розподіл хворих за перебігом захворювання

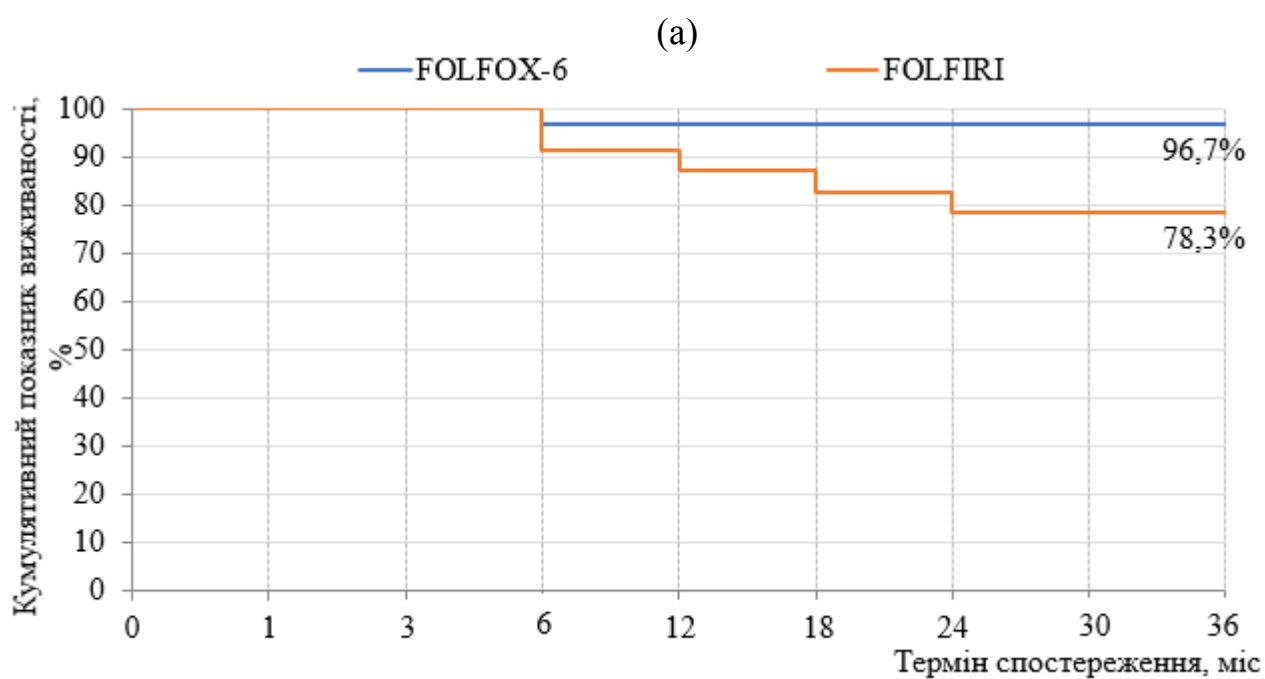
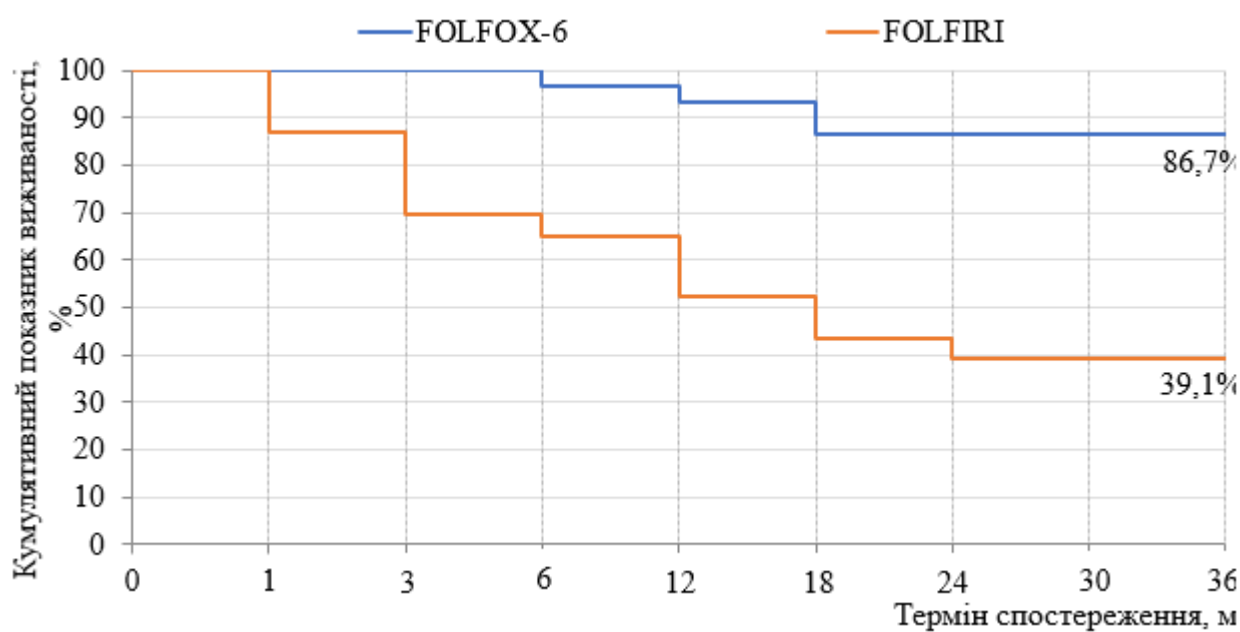
Характеристика	FOLFOX-6	FOLFIRI	Всього	Знач, р
Прогресія захворювання	4 (13,3%)	14 (60,9%)	18 (33,9%)	0,001*
Летальний випадок	1 (3,3%)	5 (21,7%)	6 (11,3%)	0,036*

Примітка: * - різниця між групами статистично значима

За характером маніфестації в 1 підгрупі у 4 (13,3%) хворих діагностували метастатичне ураження печінки. Серед даних хворих в 1 випадку було проведене оперативне лікування в об'ємі атипової резекції печінки. У 3 пацієнтів із наявністю метастатичного ураження печінки, які не підлягали хірургічному лікуванню була проведена паліативна хіміотерапія за схемою ROSSVEL- Park. При цьому, у всіх хворих на етапі прогресії терапія фторпірімідинами поєднувалась із застосуванням препарату Ербісол Ультра-фарм. Серед хворих з 1 підгрупи прогресією захворювання зафіксовано 1 (3,3%) летальний випадок.

В 2 підгрупі в прогресування захворювання виявлено у 14 хворих, з них у 12 хворих діагностували метастатичне ураження печінки, метастатичне ураження легень у 2 хворих. Частині хворих з метастатичним ураженням печінки було проведене оперативне лікування. Із 12 хворих в 4 випадках було проведене оперативне лікування в об'ємі правобічної гемігепатоктомії (1 хворий), атипова резекція печінки (1 хворий), білобарна сегментарна резекція (2 хворих). У 8 пацієнтів із наявністю метастатичного ураження печінки, які не підлягали хірургічному лікуванню була проведена паліативна хіміотерапія за схемою ROSSVEL- Park. У 14 пацієнтів терапія фторпірімідинами поєднувалась із застосуванням препарату Ербісол Ультра-фарм. 1 пацієнт прооперований з приводу солітарного вогнища в лівій легені, в якому в умовах торокального відділення проведено тораскопічне видалення патологічного вогнища. Серед 14 хворих з продовженням хвороби зафіксовано 5 (21,7%) летальних випадків.

Актуарні криві безрецидивної та загальної виживаності хворих на РПК за Капланом-Майера в залежності від схеми лікування на рис. 4.2.



(б)

Рис. 4.2. Актуарні криві безрецидивної (а) та загальної (б) виживаності хворих на РПЗ за Капланом-Майера в залежності від схеми лікування у хворих проспективної групи

У 16 (50%) пацієнтів контрольної групи зафіксовано прогресію захворювання. За характером маніфестації в контрольній групі у 14 (43,7%) хворих діагностували метастатичне ураження печінки, ще у 2 (6,2%) виявлено ураження легень. Серед хворих з метастатичним ураженням печінки в 1 випадку було проведене оперативне лікування в об'ємі атипової резекції печінки, в 1 виконана лівобічна гемігепатоектомія. У всіх пацієнтів, які не підлягали хірургічному лікуванню була проведена паліативна хіміотерапія за схемою ROSSVEL- Park. При цьому, у 8 хворих терапія фторпірімідинами поєднувалась із застосуванням препарату Ербісол Ультра-фарм.

Таблиця 4.5

Оцінка ефективності проведеного лікування

	Проспективна група (n=53)	Контрольна група (n=32)
FOLFOX-6	30 (56,6%)	32 (100%)
Прогресія захворювання	4 (13,3%)	16 (50%)
FOLFIRI	23 (43,4%)	-
Прогресія захворювання	14 (60,9%)	-
<i>Всього*</i>	53 (100%)	32 (100%)
Прогресія захворювання	18 (33,9%)	16 (50%)

Примітка: * - різниця між групами статистично значима, $p=0,001$

Співвідношення прогресії захворювання до ремісії у хворих на рак прямої кишки які лікувалися згідно вибору схем (FOLFOX-6, FOLFIRI), або тільки FOLFOX-6 відображено на рис. 4.3.

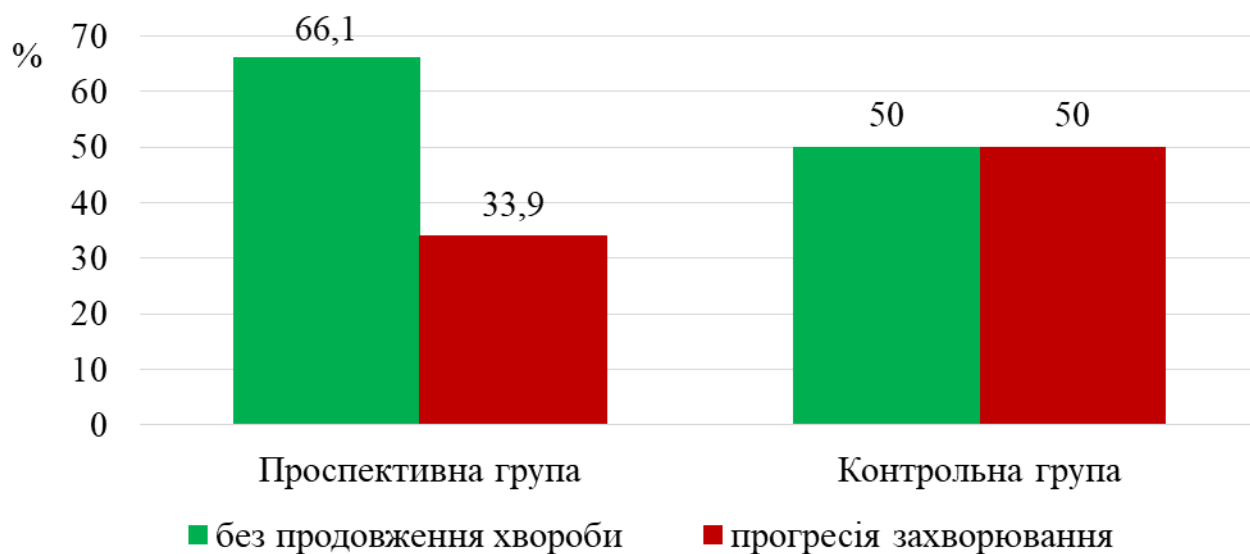
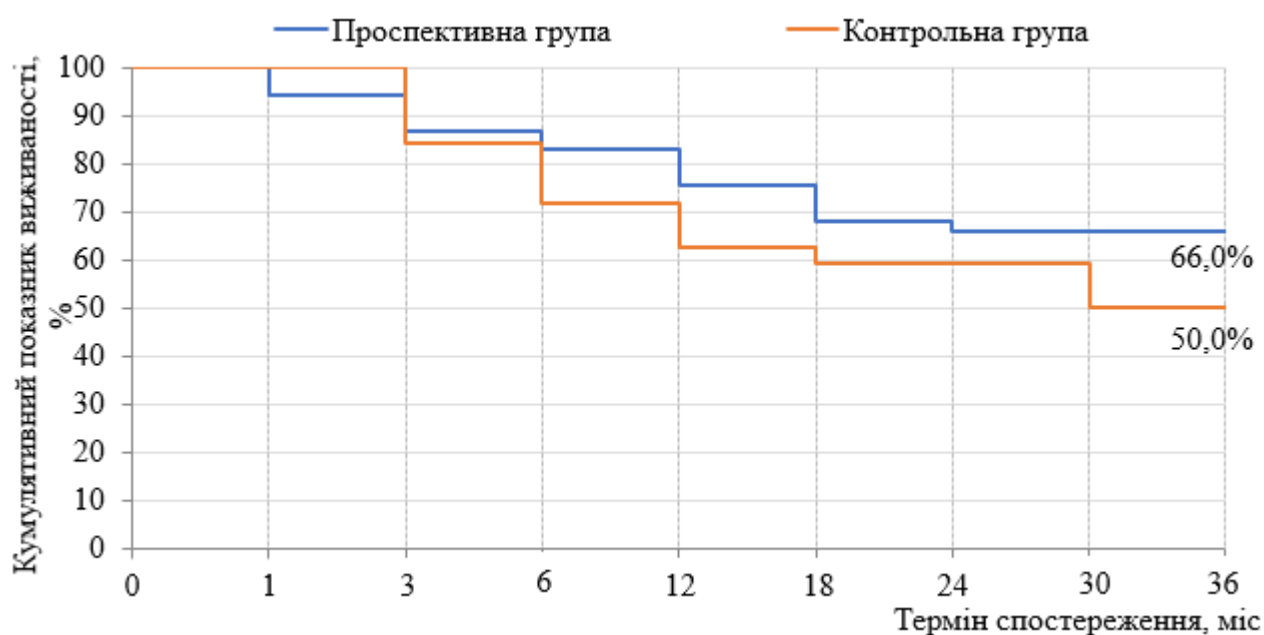


Рис. 4.3. Клінічний перебіг захворювання у пацієнтів з РПК в залежності від обраної схеми лікування.

З урахуванням контрольної групи пацієнтів, які отримували виключно платиновмісну схему ПХТ (FOLFOX-6), відсоток виживання з урахуванням запропонованого алгоритму підбору схем суттєво зріс (66,1% дослідницької групи проти 50% в контрольній групі).

Актуарні криві безрецидивної та загальної виживаності хворих на РПК за Капланом-Майєра в проспективній та контрольній групах зображено на рис. 4.4.



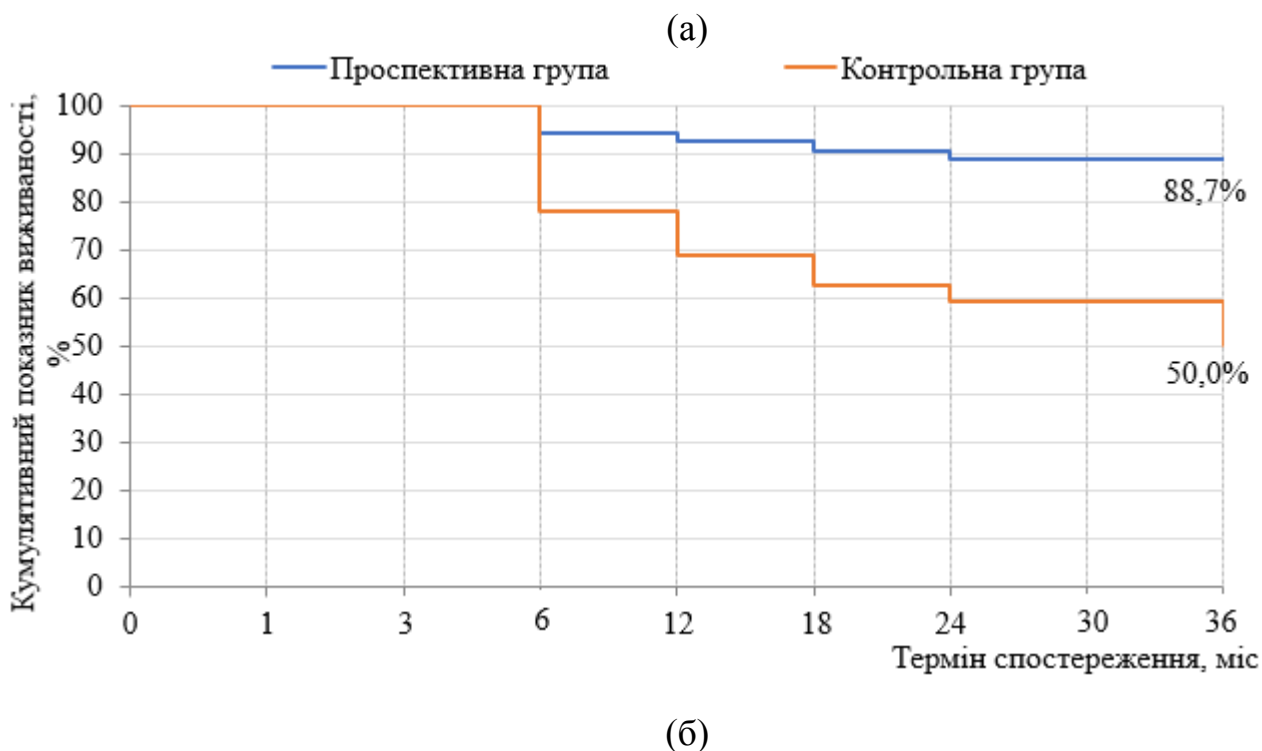


Рис. 4.4. Актуарні криві безрецидивної (а) та загальної (б) виживаності хворих на РПЗ за Капланом-Майєра в проспективній та контрольній групах

4.2. Лікування хворих на РПК із метастатичним ураженням печінки

Під час лікування хворих на РПК при метастатичному ураженні печінки застосовано препарат ЕРБІСОЛ® УЛЬТРАфарм. Його застосування мало на меті зниження побічних ефектів хіміотерапії та покращення якості життя. Отримані дані були використані в майбутніх схемах аналізу «молекулярного профілю» пухлинних клітин пацієнтів хворих на РПК, оскільки надзвичайно важливим є не тільки прогностична оцінка перебігу пухлинного процесу та ефективності лікування, але і корекція схем медикаментозного лікування для максимального підвищення ефективності лікування, підвищення терміну загальної виживаності та зменшення токсичних побічних проявів лікування.

В дослідження було включено 43 пацієнти віком від 18 років до 65 років з діагнозом РПК з метастатичним ураженням печінки котрим оперативное лечение не проводилось.

Проаналізовано 2 групи хворих:

1 група (*контрольна*, 17 пацієнтів), яким проводилась інфузійна терапія по схемою: кальцію фолінат (лейковорін) 500 мг/м² в 250 мл 0,9% розчину натрію хлориду в/в, 2-годинна інфузія щотижня на протязі 6 тижнів; 5-Фторурацил 600 мг/м² в/в через 1:00 після введення лейковоріна, щотижня на протязі 6 тижнів. Наступні курси лікування проводили через 8 тижнів (схема Roswell-Park). Всього 4 курси.

2 група (*основна*, 26 пацієнтів), яким на фоні хіміотерапії за схемою Roswell-Park проведено курс лікування препаратом ЕРБІСОЛ® УЛЬТРАфарм циклами - в/м 2 рази в день по 4 мл (2 ампули) вранці і ввечері на протязі 5 днів з інтервалом 2 дня, у час яких препарат вводять в/м 1 раз в день ввечері по 2 мл. На початку і наприкінці лікування препарат призначають в/м 1 раз в день по 2 мл (1 ампула) ввечері на протязі 3-х днів. 1 курс становив 8 циклів (6 циклів комплексно з хіміотерапією + 2 циклу після ПХТ).

В якості супутньої терапії пацієнтам по показанням призначалися антиеметики, кардіопротектори (предуктал, ритмокор), гепатопротектори (гепабене). В процесі дослідження прийом засобів, які мають імуностимулюючу дію, імуномодуляторів, імуносупресорів, біостимуляторів, біоінгібіторів, адаптогенів був виключений. Первинна оцінка загального стану пацієнтів проводилась за шкалою Карновського згідно таб. 4.6

Таблиця 4.6

Аналіз груп по суб'єктивному статусу за шкалою Карновського

Оцінка загального стану пацієнта	n	Основна група (n=26)	Контрольна група (n=17)
100%	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
90%	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
80%	13 (30,2%)	7 (26,9%)	6 (35,3%)
70%	13 (30,2%)	9 (34,6%)	4 (23,5%)
60%	17 (39,5%)	10 (38,5%)	7 (41,2%)

Примітка: * - різниця між групами статистично значима

До початку лікування всім хворим проведено пробу на чутливість до досліджуваного препарату. В жодному випадку реакція на введення не була позитивною. Також не спостерігалось реакцій уповільненої типу.

Усі випробовувані отримали повний курс лікування досліджуваним препаратом. Випадків вибування випробовуваних з дослідження в зв'язку з виникненням побічної реакції або з будь-якої іншої причини зафіксовано не було.

Після закінчення курсу лікування всі хворі були розподілені у відповідності до клінічної відповіді на наступні групи:

- а) повна регресія - зникнення пухлинних утворень;
- б) часткова регресія - зменшення суми найбільших діаметрів пухлинних утворень хоча б на 50% (порівнюється сума найбільших діаметрів, які були зафіксовані до початку лікування);
- в) прогресування - збільшення суми найбільших діаметрів пухлин мішеней хоча б на 20% (порівнюється найменша сума найбільших діаметрів, зафіксованих з початку лікування, або враховується поява одного або більше нових пухлинних утворень);
- г) стабілізація - відсутність достатнього зменшення, щоб оцінити його як «часткову регресію», і достатнього збільшення, щоб оцінити його як «прогресування». Дані про розподілі випробовуваних по градаціях попередньої оцінки ефективності представлені в табл. 4.5.

По закінченню курсу лікування у 8 (31,6%) пацієнтів основної групи було зафіксовано зменшення розмірів печінки, в контрольної групі - у 2 (13,0%) пацієнтів. Тільки у 3 (12,3%) пацієнтів основної групи було відзначено подальше прогресування процесу як за рахунок збільшення розмірів окремих вузлів, так і за рахунок збільшення кількості метастазів. В контрольної групі дана частка пацієнтів склала 68,5%. Таб.4.7

Таблиця 4.7

Оцінка ефективності лікування пацієнтів з РПК з метастатичним ураженням печінки

Клінічна відповідь	n	Основна група (n=26)	Контрольна група (n=17)
повна регресія	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
часткова регресія	9 (20,3%)	8 (31,6%)	2 (13,0%)
прогресування	20 (46,3%)	3 (12,3%)	12 (68,5%)
стабілізація	14 (33,4%)	15 (56,1%)	3 (18,5%)

Примітка: * - різниця між групами статистично значима

У хворих основної групи зафіксовано позитивний ефект і у пацієнтів з IV стадією поширення процесу, у яких симптоми захворювання були найбільш виражені. Зменшення розмірів печінки відбувалося в більшому кількості і на більший відсоток. Слід відзначити, що також змінювалося співвідношення здорової і ураженої тканини печінки в сторону збільшення здорової.

Важливо, що в основній групі хворих відмічено і більш високу якість життя пацієнтів (відсутність нудоти, блювоти, випадання волосся і інших токсичних проявів лікування). Після лікування зазначалося підвищення індексу Карновського в даній групі пацієнтів, у порівнянні з пацієнтами контрольної групи як мінімум на 1-2 градації. У більшості пацієнтів контрольної групи індекс Карновського практично залишався без змін як свідчить таб. 4.8

Таблиця 4.8

**Аналіз груп по суб'єктивному статусу за шкалою Карновського після
проведеного лікування**

Оцінка загального стану пацієнта	n	Основна група (n=26)	Контрольна група (n=17)
100%	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
90%	2 (4,6%)	2 (7,7%)	0 (0%)
80%	15 (34,9%)	8 (30,8%)	7 (41,2%)
70%	17 (39,5%)	12 (46,1%)	5 (29,4%)
60%	9 (20,9%)	4 (15,4%)	5 (29,4%)

Примітка: * - різниця між групами статистично значима

За період спостереження (16 міс.) в основний групі вижило 20 (78,6%), а в контрольної - 113 (63,5%) пацієнтів. В табл. 4.9 представлені результати аналізу характеристик ефективності проведеного лікування в залежності від часу.

Як свідчать дані, у пацієнтів основної групи спостерігались більш тривалі періоди стабілізації і часткового або повного клінічного ефекту, а також збільшилася тривалість життя.

Таблиця 4.9

Результати аналізу груп за критеріями ефективності в залежності від часу

Критерії ефективності	Група	Тривалість	P
Тривалість стабілізації, міс	Основна	9,05±2,721	0,036*
	Контрольна	7,60±1,612	
Тривалість життя, міс.	Основна	10,24±1,438	0,048*
	Контрольна	8,20±1,946	

Примітка: * - різниця між групами статистично значима

Аналіз виживання проведено з використанням методу Каплана- Майрера (рис. 4.5).

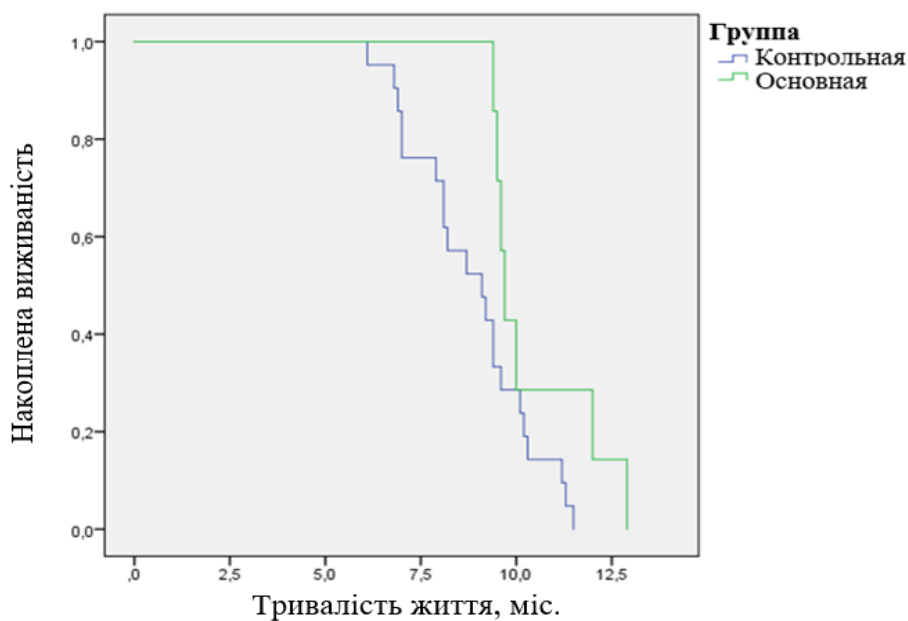


Рис. 4.5. Аналіз прогресування прогресу з допомогою кривих Каплана-Майера

Таким чином, можна стверджувати, що за результатами аналізу у пацієнтів основної групи спостерігалася достовірно більша тривалість стабілізації, частковий або повний клінічний ефект та тривалість життя.

Підсумок.

Результат використання алгоритму підбору схем хіміотерапевтичного лікування у хворих на РПК, дозволив знизити ризик виникнення прогресії захворювання у пацієнтів в 1,4 рази. Цей результат вказує на достовірну значимість оцінки маркерів Е-кадгерина і ERCC1: при комплексно низькій експресії маркера ERCC1, Торо ІІа і високій Е-кадгерина відзначений найбільш сприятливий прогноз виживання після проведення комплексного лікування хворих на РПК з використанням платиновмісних схем хіміотерапії. Використання в комплексному лікуванні схеми FOLFIRI у пацієнтів з несприятливими прогностичними показниками експресії маркерів, залишається обґрунтовано ефективним.

Отримані дані дозволяють цілеспрямовано скорегувати інтенсивність і обсяг планованого лікування пацієнта з РПК після оперативного втручання, отримавши максимально високу відповідь на проведену хіміотерапію.

Основні положення даного розділу висвітлені у наступних публікаціях [169, 172-177]

РОЗДІЛ 5

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Сьогодні спостерігається ріст захворюваності на колоректальний рак, причому висока смертність серед даної категорії хворих зумовлена в першу чергу відсутністю ефективних програм раннього виявлення пухлин та їх біологічними характеристиками: специфікою клінічного перебігу, синхронним метастазуванням та ін. За останні роки внаслідок значного прогресу в галузі фундаментальної онкології ідентифіковані та охарактеризовані ключові механізми сигнальних шляхів канцерогенезу, ряд генів та їх мутацій, що функціонально пов'язані із поведінковими особливостями злоякісно трансформованих клітин та їх чутливістю до протипухлинних впливів. При цьому стало зрозумілим, що РПК є гетерогенним захворюванням як за агресивністю перебігу пухлинного процесу, так і за відповіддю на хіміотерапевтичні агенти [178]. Не дивлячись на те, що впродовж останнього десятиріччя спостерігається стрімке збільшення арсеналу хіміопрепаратів та їх включення в схеми лікування хворих на РПК медіана виживання хворих складає близько 18 - 24 міс [179]. При цьому виживаність хворих з дисемінованими формами РПК була і залишається провідним показником якості їх лікування.

Вибір лікарської терапії хворих на РПК ґрунтується, як правило, на клінічних рекомендаціях, розроблених доказовою медициною, основним недоліком чого є відсутність врахування індивідуальних особливостей, як організму, так і пухлини, що супроводжується зниженням очікуваної ефективності та збільшенням токсичності. Оскільки сьогодні відсутні абсолютні ознаки чутливості та резистентності пухлини до терапевтичних препаратів, без урахування яких ймовірність помилки при виборі терапії для конкретного хворого достатньо висока, то не викликає сумніву необхідність

переходу до персоналізованої медицини із оцінкою молекулярно-генетичних прогностичних та предиктивних маркерів, що дозволить вірно використовувати арсенал цитостатичної терапії та раціонально підійти до лікування кожної окремої людини [180-183].

За даними дослідників та нашими попередніми даними існує велика кількість потенційних маркерів перебігу пухлинного процесу при РПК: антигени проліферації, маркери пухлинної супресії, синтезу і пошкодження ДНК, фактори росту і їх рецептори, білки, що асоційовані з інвазією, міграцією та метастазуванням злоякісно трансформованих клітин [184]. Лишаються питання про найбільш інформативні прогностичні молекулярно-генетичні маркери та їх кореляції із ефективністю лікування хворих та можливості створення адекватного алгоритму протипухлинної терапії хворих на РПК.

В даний час підбір ефективної ПХТ для лікування хворих на РПК залишається серйозною проблемою, оскільки досить часто використання сучасних терапевтичних схем не супроводжується очікуваним позитивним ефектом. Це обумовлює необхідність пошуку нових шляхів підвищення ефективності медикаментозного лікування. Серед таких шляхів в останні роки особливу увагу дослідників привертає так звана таргетна терапія, що базується на здатності препаратів модифікувати конкретні молекули – патогенетичної ланки процесу злоякісної трансформації клітин, а також фенотипові властивості пухлинних клітин. Можна сподіватись, що такі дослідження в майбутньому принесуть позитивні результати, проте в даний час в медикаментозному лікуванні хворих на РПК використовують традиційні схеми цитотоксичної ПХТ; найефективнішими з них вважають FOLFOX і FOLFIRI, що включають препарати платини, іринотекан і 5-флуороурацил. Слід однак зазначити, що позитивна відповідь на лікування зазначеними препаратами не перевищує 50%, а іноді і зовсім відсутня [185-187, 163]. Сказане визначає актуальність пошуку предиктивних маркерів резистентності ПК до цитостатиків, оскільки за її наявності високотоксична ПХТ з низкою побічних

ефектів стає недоцільною.

Обнадійливим в даному напрямку є визначення в злоякісно трансформованих клітинах ферментів групи топоізомераз, зокрема топоізомерази II-альфа, що є відомим маркером чутливості пухлинних клітин (в тому числі РПК), до дії антрациклінових протипухлинних та до етопозиду і теніпозиду, а також мішенню для препаратів платини [188, 189]. Суттєву роль у формуванні лікарської стійкості пухлин грають ферменти, що беруть участь у репарації ДНК після пошкодження протипухлинними засобами, а саме: ERCC1, ERCC2, XRCC1 та їх аналоги; щодо цих маркерів чітко доведено взаємозв'язок між низьким рівнем їх експресії і відповіддю пухлини на цитостатик (карбоплатин або оксаліплатин) при злоякісних пухлинах яєчника, стравоходу, шлунка і товстої кишки [120, 121].

Окрім вивчення білків, пов'язаних безпосередньо з лікарською чутливістю / резистентністю, ми вважали необхідним та актуальним розглянути в даній роботі і експресію маркерів ЕМП ПК, оскільки даний процес відіграє провідну роль у набутті клітинами злоякісного фенотипу та лікарської стійкості. Порушення балансу епітеліальних клітин у мікрооточенні пухлини та індукція ЕМП в ініціації інвазивно-метастазуючого потенціалу злоякісно трансформованих клітин можуть бути мішенню клітинної регуляції в протипухлинній терапії [190]. Зокрема, втрата експресії Е-кадгерину — сигнальної молекули міжклітинної адгезії та переключення на β -катенін-Wnt сигнальний шлях розглядається як фундаментальна подія в процесі ЕМП при пухлинній прогресії: втратаю адгезивності пухлинних клітин швидше за все обумовлена й індукція інвазивно-метастазуючого потенціалу злоякісно трансформованих клітин, що відкриває нові підходи до регуляції цих процесів, в тому числі і епігенетичної, в протипухлинній терапії.

За даними ретроспективного аналізу матеріалу від хворих на РПК щодо експресії маркерів ЕМП та білків, асоційованих з лікарською резистентністю нами було встановлено, що тільки наявність Е-кадгерин⁺ ПК в біопсійному

матеріалі свідчить про позитивний прогноз, при цьому для прогнозування ефективності проведення у хворих на РПК з використанням ПХТ платиновмісних схем потрібна оцінка ПК як мінімум за двома імуногістохімічними показниками: Торо II-α та ERCC1: детекція даних антигенів (в комплексному або монорежимі) у великій кількості клітин (число позитивних клітин в пухлинах >40%) суттєво зменшує відсоток пацієнтів із тривалим безрецидивним періодом та погіршує загальну виживаність при застосуванні стандартного підходу до лікування хворих на РПК платиновмісними схемами. Показано, що у хворих з фенотипом Торо II-α⁺ / ERCC1⁺ ефективність використання оксаліплатину в терапевтичних схемах значно знижується і застосування таких схем виявляється недостатньо аргументованим.

За даними проспективного аналізу, встановлено, що для прогнозування перебігу пухлинного процесу, а саме для оцінки ризику прогресії захворювання або вживаності, найбільш інформативними також є показники E-cadherin, ERCC1 та Торо IIα. Для визначення інформативності даних маркерів, які є граничними для віднесення пацієнтів до групи підвищеного ризику застосовано ROC-аналіз, який дозволяє шляхом варіації значення рівня експресії маркеру, визначати долю вірного віднесення хворого до однієї з двох досліджуваних груп. Подібна закономірність дозволила побудувати прогностичну модель з метою визначення ймовірності настання прогресії захворювання:

$$p = \frac{1}{1+e^{-y}}, \text{ де } y = -E\text{-cadherin} \cdot 0,003 + ERCC1 \cdot 0,231 - 3,227$$

При цьому аналіз прогностичної можливості побудованої моделі дозволив отримати показники чутливості 0,997 та специфічності 0,889, загальний процент правильно класифікованих значень – 96,7%.

За допомогою проведеного статистичного аналізу результатів щодо експресії досліджених маркерів було сформовано певний алгоритм оцінки ефективності схем хіміотерапевтичного лікування у хворих на РПК, який в результаті дозволив знизити ризик виникнення прогресії захворювання у

пацієнтів в 1,4 рази. Крім того була показана достовірна значимість оцінки маркерів Е-кадгерина і ERCC1: при комплексно низькій експресії маркера ERCC1, Торо ІІа і високій Е-кадгерина відзначений найбільш сприятливий прогноз виживання після проведення комплексного лікування хворих на РПК з використанням платиновмісних схем хіміотерапії. Отримані дані дозволяють цілеспрямовано скорегувати інтенсивність і обсяг планованого лікування пацієнта з РПК після оперативного втручання, отримавши максимально високу відповідь на проведену хіміотерапію.

Таким чином, отримані нами дані показали, що досліджені фенотипові маркери та їх певні комбінації можуть бути досить інформативними для прогнозу перебігу пухлинного процесу та загальної виживаності хворих. Сьогодні все більше з'являється даних, що ПК в процесі ЕМП характеризуються низькою чутливістю до протипухлинного впливу. Зокрема, показано, що в клітинах ліній РПК, в яких формують резистентність до платиновмісних препаратів, спостерігається домінування ознак мезенхімального фенотипу (із зменшенням кількості Е-кадгерин⁺-клітин та збільшення кількості Віментин⁺ клітин). Частково це може бути пов'язано з активацією оксаліплатином програми ЕМП через активацію сигнального шляху Fas в злоякісно трансформованих клітинах [191, 192]. Крім того, відомо, що експресія індукторів ЕМП - SNAIL1 та TGFβ в клітинах РПК підвищує їх стійкість до флуороурацилу [193-195]. Дослідження нами характеру експресії в первинній пухлині маркерів ЕМП дає можливість передбачити наявність в популяції клітин із стовбуровими характеристиками. Такі клітини, по-перше, відрізняються лікарською резистентністю, і, по-друге, вони можуть утворювати дисеміновані пухлинні мікрометастази, що дуже важливо з точки зору прогнозування перебігу пухлинного процесу.

Результати даного дослідження підтверджують досить обмежені, на даний час, відомості щодо вагомості ролі ЕМП в протіканні пухлинного процесу у хворих на РПК. Визначення запропонованого нами антигенного

фенотипового комплексу в первинних пухлинах РПК показало значимість та інформативність такого підходу для прогнозування перебігу пухлинного процесу у хворих на РПК.

На підставі оцінки отриманих даних побудовано алгоритм з найбільш інформативними показниками даної групи маркерів при виборі платиносодержащих схем хіміотерапії. Використання запропонованого алгоритму оцінки показників біометричних маркерів дозволило істотно підвищити виживаність пацієнтів після комбінованого лікування в групі з використанням платиновмісних схем хіміотерапії. В той же час 3-річна загальна виживаність пацієнтів дослідницької групи також показує значне зростання (на 65%), що дозволяє говорити про ефективність запропонованого алгоритму вибору платиновмісних схем ПХТ. Варто відзначити той факт, що виживаність хворих з дисемінованими формами РПК залишається головним показником якості їх лікування. Вибір схем лікування хворих на РПК ґрунтується на клінічних рекомендаціях, запропонованих доказовою медициною, що несе в собі істотний недолік - відсутність обліку індивідуальних особливостей організму і характеристики пухлини, а це, в свою чергу, знижує очікуваний ефект від ПХТ. Наразі не розроблено чітких ознак чутливості і резистентності пухлини до хіміопрепаратів, що призводить до ймовірної помилки і несприятливого перебігу захворювання та негативному прогнозу. Тільки перехід до персоналізованої медицини, з оцінкою молекулярно-генетичних прогностичних маркерів, істотно збільшить відсоток позитивних відповідей на проведену терапію і підвищить, відповідно, ефективність лікування в цілому. Це дозволить більш адекватно і цілеспрямовано використовувати спектр цитостатиків і індивідуально підходити до лікування кожного пацієнта [196, 197, 182, 198]. На сьогоднішній день робочими схемами для лікування РПК залишаються схеми FOLFOX-6 і FOLFIRI, без специфічної індивідуальної рекомендаційної прив'язки при призначенні. Рівноцінність в ефективності вибору тієї чи іншої схеми в загальній масі пролікованих хворих можна

порівняти в межах незначних коливань [196]. Амбітним завданням може стати підбір алгоритму при виборі однієї з схем хіміотерапії, при якому не тільки пацієнти вибору виявляться з високим відсотком виживання, а й дослідницька група в цілому [197]

ВИСНОВКИ

Підвищення ефективності лікування хворих на РПК є нагальною проблемою сучасної онкології. Наразі основним підґрунтям при виборі терапевтичних схем лікування хворих на РПК часто є лише клінічна характеристика хворого. Проте такий підхід не є досить ефективним, про що свідчать низькі показники виживаності даної категорії хворих. З погляду на це перспективними є наукові дослідження, присвячені пошуку прогностичних та предиктивних маркерів, зокрема фенотипових маркерів пухлинних клітин, які дозволять цілеспрямовано скорегувати інтенсивність і обсяг планованого лікування хворих на РПК після оперативного втручання, і, відповідно, отримати максимально високу відповідь на проведену хіміотерапію.

1. Проаналізовано профіль експресії Е-кадгерину, Twist, ERCC1 і Торо Па у пухлинних клітинах хворих на РПК та не встановлено достовірного зв'язку між даними показниками та віком пацієнта, стадією захворювання, розміром пухлини, ступенем поширеності пухлинного процесу у регіонарні лімфатичні вузли, ступенем диференціювання пухлини та локалізацією пухлинного процесу ($p > 0,05$).

2. Виявлено зв'язок між характером перебігу захворювання, загальною 3-річною виживаністю хворих на РПК та показниками експресії Е-кадгерину, ERCC1 і Торо Па: наявність Е-кадгерин+ клітин у пухлині свідчить про позитивний прогноз щодо перебігу пухлинного процесу та виживаності пацієнтів ($p = 0,048$ і $p = 0,047$ відповідно), тоді як експресія в ПК Торо Па ($p = 0,045$ і $p = 0,012$) та ERCC1 ($p = 0,032$ і $p = 0,017$) достовірно погіршує його.

3. Визначено, що достовірно інформативними показниками позитивного прогнозу тривалості безрецидивного періоду та загальної 3-річної виживаності хворих після проведеного комплексного лікування з використанням платиновмісної схеми ПХТ є наявність фенотипової комбінації маркерів Е-

кадгерин+/ERCC1⁻ ($p=0,012$ і $p=0,011$ відповідно) та Е-кадгерин+/Торо Па⁻ ($p=0,159$ і $p=0,002$ відповідно). В свою чергу, виявлення в пухлинах Е-кадгерин⁻/ERCC1⁺ ($p=0,001$ і $p=0,038$ відповідно) та Е-кадгерин⁻/Торо Па⁺ ($p=0,001$ і $p=0,11$) клітин асоційовано з погіршенням прогнозу перебігу захворювання та зниженням загальної 3-річної виживаності хворих.

4. Встановлено необхідність комплексного визначення профілю експресії Е-кадгерину, ERCC1 та Торо Па при прогнозуванні перебігу пухлинного процесу у хворих на РПК. Виявлено високу інформативність порогових значень рівня експресії Е-кадгерину, ERCC1 та Торо Па при прогнозуванні перебігу захворювання ($p=0,001$, $p=0,001$ і $p=0,190$ відповідно) та загальної виживаності ($p=0,002$, $p=0,026$ і $p=0,028$ відповідно) у хворих на РПК після застосування платиновмісних схем ПХТ. За варіантом комбінації наявності/відсутності експресії відразу трьох маркерів - Е-кадгерину, ERCC1 та Торо Па, у ПК сформовано групи пацієнтів із низьким - Е-кадгерин⁺ /ERCC1⁻ /Торо Па⁻; підвищеним - Е-кадгерин⁻ /ERCC1⁻ /Торо Па⁻; Е-кадгерин⁻ /ERCC1⁻ /Торо Па⁺ та високим - Е-кадгерин⁺ /ERCC1⁺ /Торо Па⁻; Е-кадгерин⁻ /ERCC1⁺ /Торо Па⁺; Е-кадгерин⁺ /ERCC1⁻ /Торо Па⁺; Е-кадгерин⁺ / ERCC1⁺ /Торо Па⁺ ризиком продовження хвороби та зниження загальної виживаності після застосування платиновмісних схем ПХТ.

5. Доведено ефективність використання платиновмісних схем ПХТ у комплексному лікуванні хворих на РПК із фенотипом ПК Е-кадгерин⁺ /ERCC1⁻ /Торо Па⁻ та за умов експресії лише одного із маркерів, асоційованих із медикаментозною стійкістю. Використання у комплексному лікуванні пацієнтів із негативним прогнозом перебігу захворювання (за показниками експресії досліджених маркерів) схеми FOLFIRI залишається обґрунтовано ефективним.

6. Застосування запропонованого алгоритму підбору індивідуалізованих схем ПХТ у хворих на РПК після проведеного радикального хірургічного

лікування дозволило підвищити ефективність лікування хворих на РПК шляхом покращення як загальної, так і безрецидивної 3-річної виживаності, зниження виникнення прогресії захворювання в 1,47 разу, збільшення відсотка хворих без подовження хвороби у 1,32 разу у порівнянні із хворими, у яких використовували схеми ПХТ без попереднього визначення профілю експресії Е-кадгерину, ERCC1 і Торо ІІа.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Prashanth Rawla, Tagore Sunkara, and Adam Barsouk. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors *Prz Gastroenterol.* 2019; 14(2): 89–103.
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018; 68: 394–424.
3. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, et al. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut.* 2017;66:683–91.
4. De Rosa M, Pace U, Rega D, et al. Genetics, diagnosis and management of colorectal cancer (Review) *Oncol Rep.* 2015;34:1087–96.
5. С.А. Шалімов, Ю.А.Гріневіч, Д.В. Мясоєдов. Довідник з онкології / Київ, 2000р.: 435-444.
6. Pablo Vega, Fátima Valentín, and Joaquín Cubiella Colorectal cancer diagnosis: Pitfalls and opportunities *World J Gastrointest Oncol.* 2015 Dec 15; 7(12): 422–433.
7. Liu CC, Cai DL, Sun F, Wu ZH, Yue B, Zhao SL, Wu XS, Zhang M, Zhu XW, Peng ZH, Yan DW. FERMT1 mediates epithelial-mesenchymal transition to promote colon cancer metastasis via modulation of β -catenin transcriptional activity. *Oncogene.* 2017, Mar 30;36(13):1779-1792.
8. Hai Luo, Kexin Shen, Bo Li. et al. Clinical significance and diagnostic value of serum NSE, CEA, CA19-9, CA125 and CA242 levels in colorectal cancer. *Oncology Letters* 2020, 20 (1): 742-750.
9. Sideris M, Papagrigoriadis S. Molecular biomarkers and classification models in the evaluation of the prognosis of colorectal cancer. *Anticancer Res.* 2014;34:2061–8.
10. Mimmo T, Paolo D, D. Rega. Promising colorectal cancer biomarkers for precision prevention and therapy. *Cancers.* 2019; 11(12):1932

11. Ewing I, Hurley JJ, Josephides E, Millar A. The molecular genetics of colorectal cancer. *Frontline Gastroenterol.* 2014;5:26–30..
12. Song M, Garrett WS, Chan AT. Nutrients, foods, and colorectal cancer prevention. *Gastroenterology.* 2015;148:1244–60e1216.
13. Markus Rentsch, Tobias Schiergens, Andrej Khandoga, and Jens Werner. Surgery for Colorectal Cancer - Trends, Developments, and Future Perspectives. *Visc Med.* 2016 Jun; 32(3): 184–191.
14. Willaert W, Ceelen W. Extent of surgery in cancer of the colon: is more better? *World J Gastroenterol.* 2015;21:132–138.
15. Özgür Akgül, Erdinç Çetinkaya, Şiyar Ersöz, and Mesut Tez. Role of surgery in colorectal cancer liver metastases. *World J Gastroenterol.* 2014 May 28; 20(20): 6113–6122.
16. Tournigand C, Andre T, Achille E, et al. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study / *J Clin Oncol.* 2004. – v. 22: P.1201–8.
17. Alfred I Neugut -, Aijing Lin -, Gabriel T Raab, et al. FOLFOX and FOLFIRI Use in Stage IV Colon Cancer: Analysis of SEER-Medicare Data *Clin Colorectal Cancer*, 2019 Jun;18(2):133-140.
18. Matthias F. Häfner and Jürgen Debus. Radiotherapy for Colorectal Cancer: Current Standards and Future Perspectives *Visc Med.* 2016 Jun; 32(3): 172–177.
19. Wolff HA, Wagner DM, Conradi LC, Hennies S, Ghadimi M, Hess CF, Christiansen H. Irradiation with protons for the individualized treatment of patients with locally advanced rectal cancer: a planning study with clinical implications. *Radiother Oncol.* 2012;102:30–37.
20. Кит О.И., Колесников Е.Н., Максимов А.Ю., Снежко А.В., Сагакянц А.Б., Аль-Хадж Н.К., Аверкин М.А., Златник Е.Ю., Ситковская А.О. Комбинированное лечение рака прямой кишки с использованием предоперационной лучевой терапии / *Современные проблемы науки и*

образования. – 2018. – № 4.; <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=27675>

21. Гусарева М.А., Розенко Л.Я., Непомнящая Е.М., Новикова И.А., Ульянова Е.П. Неoadьювантная лучевая терапия рака прямой кишки / Современные проблемы науки и образования. – 2017. – № 2.; <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=26352>

22. Camma C, Giunta M, Fiorica F, et al.: Preoperative radiotherapy for resectable rectal cancer: a meta-analysis / JAMA 2000. - v. 284: 1008-1015.

23. Baldeep Pabla, Marc Bissonnette, and Vani J Konda Colon cancer and the epidermal growth factor receptor: Current treatment paradigms, the importance of diet, and the role of chemoprevention. World J Clin Oncol. 2015 Oct 10; 6(5): 133–141.

24. Dougherty U, Mustafi R, Valuckaite V, Konda VJ, Pekow J, Sadiq F, Haider HI, Adhikari S, Hart J, Joseph L, et al. Western diet up-regulates ADAM17, a key mediator of EGFR signaling via activation of colonic renin-angiotensin system and inhibition of miR-145,-148a and -152. *Gastroenterology*. 2015;148:S–99.

25. Pietrantonio F, Vernieri C, Siravegna G, Mennitto A, Berenato R, Perrone F, *et al.* Heterogeneity of Acquired Resistance to Anti-EGFR Monoclonal Antibodies in Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res*. 2017; 15;23(10):2414–2422.

26. Diaz LA Jr, Williams RT, Wu J, Kinde I, Hecht JR, Berlin J, et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature*. 2012;486:537–40.

27. Harari PM, Huang SM. Searching for reliable epidermal growth factor receptor response predictors: commentary re M.K. Nyati et al., Radiosensitization by pan-ErbB inhibitor CI-1033 in vitro and in vivo / *Clin. Cancer Res*. 2004. – v.15;10(2): 428-32

28. Montagut C, Dalmases A, Bellosillo B, Crespo M, Pairet S, Iglesias M, et al. Identification of a mutation in the extracellular domain of the epidermal growth

factor receptor conferring cetuximab resistance in colorectal cancer. *Nat Med.* 2012;18:221–3.

Kim J.S., Kim J.M., Li S. et al. Epidermal growth factor receptor as a predictor of tumor downstaging in locally advanced rectal cancer patients treated with preoperative chemora-diotherapy/ *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006; 66: 195–200.

29. Saigusa S., Tanaka K., Toiyama Y. et al. Gene expression profiles of tumor regression grade in locally advanced rectal cancer after neoadjuvant chemoradiotherapy. *Oncol Rep* 2012;28(3):855–61. doi: 10.3892/ or.2012.1863. 7.

30. Gaedcke J., Grade M., Jung K. et al. KRAS and BRAF mutations in patients with rectal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy. *Radiother Oncol* 2010; 94(1):76–81.

31. Bernhard E.J., McKenna W.G., Hamilton A.D. et al. Inhibiting Ras prenyl-ation increases the radiosensitivity of human tumor cell lines with activating mutations of ras oncogenes. *Cancer Res* 1998;58(8):1754–61.

32. Guido Giordano, Andrea Remo, Almudena Porras, and Massimo Pancione. Immune Resistance and EGFR Antagonists in Colorectal Cancer. Cancers (Basel). 2019 Aug; 11(8): 1089.

33. Qing-Hai Li, Ying-Zhao Wang, Jian Tu, et al. Anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer: mechanisms and potential regimens of drug resistance. *Gastroenterology Report*, 2020, Volume 8, Issue 3: 179–191.

34. Mauri G., Pizzutilo E.E., Amatu A., Bencardino K., Palmeri L., Bonazzina E.E., Tosi F., Carlo Stella G., Burrafato G., Scaglione F., et al. Retreatment with anti-EGFR monoclonal antibodies in metastatic colorectal cancer: Systematic review of different strategies. *Cancer Treat Rev.* 2019;73:41–53.

35. Zhai Z., Yu X., Yang B., Zhang Y., Zhang L., Li X., Sun H. Colorectal cancer heterogeneity and targeted therapy: Clinical implications, challenges and solutions for treatment resistance. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2017;64:107–115.

36. Николаенко А. Н., Кудрявец Ю. Й., Воронцова А. Л., Чишкевич Ю. В., Сичкориз О. Е., Жильчук В. Е. Клиническая эффективность препаратов класса «Эрбисол» в лечении больных колоректальным раком с метастазами в печень. Современная фармация. – 2013; № 03: 63-68.
37. Johannes J. M. Kwakman, Rob C. M. van Kruijsdijk, et al. Choosing the right strategy based on individualized treatment effect predictions: combination versus sequential chemotherapy in patients with metastatic colorectal cancer. *Acta Oncologica* – 2019;58 (3): 326-333.
38. Abdallah EA, Fanelli MF, Buim ME, Machado Netto MC, Gasparini Junior JL, Souza E Silva V, Dettino AL, Mingues NB, Romero JV, Ocea LM, et al. Thymidylate synthase expression in circulating tumor cells: a new tool to predict 5-fluorouracil resistance in metastatic colorectal cancer patients. *Int J Cancer*. 2015;137:1397–1405.
39. Che J, Pan L, Yang X, Liu Z, Huang L, Wen C, Lin A, Liu H. Thymidine phosphorylase expression and prognosis in colorectal cancer treated with 5-fluorouracil-based chemotherapy: A meta-analysis. *Mol Clin Oncol*. 2017;7:943–952.
40. Madi A, Fisher D, Maughan TS, Colley JP, Meade AM, Maynard J, Humphreys V, Wasan H, Adams RA, Idziaszczyk S, Harris R, Kaplan RS, Cheadle JP. Pharmacogenetic analyses of 2183 patients with advanced colorectal cancer; potential role for common dihydropyrimidine dehydrogenase variants in toxicity to chemotherapy / *Eur J Cancer*. 2018;102: 31-39.
41. Palshof JA, Høgdall EV, Poulsen TS, Linnemann D, Jensen BV, Pfeiffer P, Tarpgaard LS, Brünner N, Stenvang J, Yilmaz M, et al. Topoisomerase I copy number alterations as biomarker for irinotecan efficacy in metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer*. 2017;17:48.
42. Lin S, Lai H, Qin Y, Chen J, Lin Y. Thymidine phosphorylase and hypoxia-inducible factor 1- α expression in clinical stage II/III rectal cancer:

association with response to neoadjuvant chemoradiation therapy and prognosis. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8:10680–10688.

43. Kugimiya N, Harada E, Suehiro Y, Suga A, Takemoto Y, Hamano K. Determination of thymidine phosphorylase expression level facilitates recurrence risk stratification in stage II/III colorectal cancer following adjuvant chemotherapy with oral fluoropyrimidines / *Oncol Lett*. 2019 Jun;17(6):5267-5274.

44. Kevin Van der Jeught, Han-Chen Xu, Yu-Jing Li, Xiong-Bin Lu, and Guang Ji. Drug resistance and new therapies in colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2018 Sep 14; 24(34): 3834–3848.

45. Amiri-Kordestani L., Basseville A., Kurdziel K. et al. Targeting MDR in breast and lung cancer: Discriminating its potential importance from the failure of drug resistance reversal studies / *Drug Resistance Updates*. – 2012.

46. Kathawala R.J., Gupta P., Ashby C.R., Chen Z.-S. The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: A review of the past decade / *Drug Resistance Updates*. – 2015. – Vol. 18: 1-17.

47. Young Hee Choi and Ai-Ming Yu. ABC Transporters in Multidrug Resistance and Pharmacokinetics, and Strategies for Drug Development. *Curr Pharm Des*. 2014; 20(5): 793–807.

48. Andersen V, Svenningsen K, Knudsen LA, Hansen AK, Holmskov U, Stensballe A, Vogel U. Novel understanding of ABC transporters ABCB1/MDR/P-glycoprotein, ABCC2/MRP2, and ABCG2/BCRP in colorectal pathophysiology. *World J Gastroenterol*. 2015 Nov 7;21(41):11862-76. doi: 10.3748/wjg.v21.i41.11862.

49. Coleman JA, Quazi F, Molday RS. Mammalian P4-ATPases and ABC transporters and their role in phospholipid transport / *Biochim Biophys Acta*. 2013;1831:555–574.

50. Mack JT, Beljanski V, Tew KD, Townsend DM. The ATP-binding cassette transporter ABCA2 as a mediator of intracellular trafficking / *Biomed Pharmacother*. 2006;60: 587–592.

51. Coleman JA, Quazi F, Molday RS. Mammalian P4-ATPases and ABC transporters and their role in phospholipid transport/ *Biochim Biophys Acta*. 2013;1831: 555–574.
52. Mack JT, Beljanski V, Tew KD, Townsend DM. The ATP-binding cassette transporter ABCA2 as a mediator of intracellular trafficking / *Biomed Pharmacother*. 2006;60: 587–592.
53. Slot AJ, Molinski SV, Cole SP. Mammalian multidrug-resistance proteins (MRPs). *Essays Biochem*. 2011;50:179-207.
54. Fu D, Arias IM. Intracellular trafficking of P-glycoprotein. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012;44:461-464.
55. Chen J, Ding Z, Peng Y, Pan F, Li J, Zou L, Zhang Y, Liang H. HIF-1 α inhibition reverses multidrug resistance in colon cancer cells via downregulation of MDR1/P-glycoprotein. *PLoS One*. 2014;9:e98882.
56. Dongxing Cao, Shaolan Qin, Yifei Mu, and Ming Zhong. The role of MRP1 in the multidrug resistance of colorectal cancer. Oncol Lett. 2017 Apr; 13(4): 2471–2476.
57. Ji L, Wei Y, Jiang T, Wang S. Correlation of Nrf2, NQO1, MRP1, cmyc and p53 in colorectal cancer and their relationships to clinicopathologic features and survival. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7:1124–1131.
58. Micsik T, Lorincz A, Mersich T, Baranyai Z, Besznyák I Jr, Dede K, Zaránd A, Jakab F, Szöllösi LK, Kéri G, et al. Decreased functional activity of multidrug resistance protein in primary colorectal cancer. *Diagn Pathol*. 2015;10:26. doi: 10.1186/s13000-015-0264-6.
59. Kathawala RJ, Gupta P, Ashby CR, Jr, Chen ZS. The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: A review of the past decade. *Drug Resist Updat*. 2015;18:1–17.
60. Lee JH, Um JW, Lee JH, Kim SH, Lee ES, Kim YS. Can immunohistochemistry of multidrug-resistant proteins replace the histoculture drug

response assay in colorectal adenocarcinomas? Hepatogastroenterology. 2012;59:1075–1078.

61. Albermann N, Schmitz-Winnenthal FH, Z'graggen K, Volk C, Hoffmann MM, Haefeli WE, Weiss J. Expression of the drug transporters MDR1/ABCB1, MRP1/ABCC1, MRP2/ABCC2, BCRP/ABCG2, and PXR in peripheral blood mononuclear cells and their relationship with the expression in intestine and liver / Biochem Pharmacol. 2005;70: 949–958.

62. Kumar A, Priyamvada S, Soni V, Anbazhagan AN, Gujral T, Gill RK, Alrefai WA, Dudeja PK, Saksena S. Angiotensin II Inhibits P-glycoprotein in Intestinal Epithelial Cells. Acta Physiol (Oxf). 2019 Jun 8:e13332. doi: 10.1111/apha.13332.[Epub ahead of print] PubMed PMID: 31177627.

63. Ditunno P, Battaglia M, Selvaggio O, Garofalo L, Lorusso V, et al. (2005) Clinical Evidence Supporting the Role of Lonidamine for the Treatment of BPH. Rev Urol 7: Suppl 7S27–33.

64. Choi YH, Yu AM. ABC transporters in multidrug resistance and pharmacokinetics, and strategies for drug development. Curr Pharm Des. 2014;20(5):793-807. Review. PubMed PMID: 23688078; PubMed Central PMCID: PMC6341993.

65. Імянітов Е.Н. Клініко- молекулярні аспекти колоректального раку: етіопатогенез, профілактика, індивідуалізація лікування / Практична онкологія. 2005. - Т.6, № 2: 65-70.

66. Равчеева А.Б., Богуш А.Є., Богуш Т.А. Вплив ABC - транспортерів на внутрішньоклітинний розподіл протипухлинних препаратів і внесок цієї характеристики в фенотип множинної лікарської резистентності / Антибіотики і хіміотерапія. 2005. - т.50, № 2-3: 22-28.

67. Fatma Saffeyeldin Mohamed¹, Mirhan M. Elkady², Eman Fekry Mohamed, et al. Study of Glutathione-S-Transferase, Cancer Embryonic Antigen and Carbohydrate Antigen 19-9 in Ulcerative Colitis and Colorectal Cancer. Basic Sciences of Medicine. 2015; 4(4): 58-66

68. Justyna Klusek¹, Anna Nasierowska-Guttmejer², Artur Kowalik, et al. *GSTM1*, *GSTT1*, and *GSTP1* polymorphisms and colorectal cancer risk in Polish nonsmokers. *Oncotarget*. 2018; 9:21224-21230.
69. Wiese M, Stefan SM. The A-B-C of small-molecule ABC transport protein modulators: From inhibition to activation-a case study of multidrug resistance-associated protein 1 (ABCC1). *Med Res Rev*. 2019 Apr 3. doi: 10.1002/med.21573
70. Hussein N, Ashby CR Jr, Amawi H, Nyinawabera A, Vij A, Khare VM, Karthikeyan C, Tiwari AK. Cariprazine, A Dopamine D₂ /D₃ Receptor Partial Agonist, Modulates ABCG2-Mediated Multidrug Resistance in Cancer. *Cancers (Basel)*. 2018 Sep 4;10(9). pii: E308. doi: 10.3390/cancers10090308.
71. Dziegiel P, Pula B, Kobierzycki C, Stasiolek M, Podhorska-Okolow M: The role of metallothioneins in carcinogenesis. *Metallothioneins in Normal and Cancer Cells* 2016, 218:29–63.
72. Krizkova S, Kepinska M, Emri G, Eckschlager T, Stiborova M, Pokorna P, Heger Z, Adam V. An insight into the complex roles of metallothioneins in malignant diseases with emphasis on (sub)isoforms/isoforms and epigenetics phenomena. *Pharmacol Ther*. 2018;183:90–117.
73. Manfei Si and Jinghe Lang The roles of metallothioneins in carcinogenesis. *Journal of Hematology & Oncology*, 2018, 11:107 <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0645-x>
74. Zheng Y, Jiang L, Hu Y, Xiao C, Xu N, Zhou J, Zhou X. Metallothionein 1H (MT1H) functions as a tumor suppressor in hepatocellular carcinoma through regulating Wnt/beta-catenin signaling pathway. *BMC Cancer*. 2017;17:161.
75. Yeh KH, Cheng AL, Wan JP, Lin CS, Liu CC: Down-regulation of thymidylate synthase expression and its steady-state mRNA by oxaliplatin in colon cancer cells. *Anticancer Drugs* 2004;15: 371-376.

76. Wang DS, Patel A, Shukla S, Zhang YK, Wang YJ, Kathawala RJ, Robey RW, Zhang L, Yang DH, Talele TT, Bates SE, Ambudkar SV, Xu RH, Chen ZS. Icotinib antagonizes ABCG2-mediated multidrug resistance, but not the pemetrexed resistance mediated by thymidylate synthase and ABCG2. *Oncotarget*. 2014 Jun 30;5(12):4529-42. PubMed PMID: 24980828; PubMed Central PMCID: PMC4147343.
77. Prakash R, et al. Homologous recombination and human health: the roles of BRCA1, BRCA2, and associated proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015;7(4):a016600.
78. Kuchenbaecker KB, et al. Risks of breast, ovarian, and contralateral breast cancer for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Jama*. 2017;317(23):2402–16.
79. Ali M, Delozier CD, Chaudhary U. BRIP-1 germline mutation and its role in colon cancer: presentation of two case reports and review of literature. *BMC Med Genet*. 2019 May 7;20(1):75. doi: 10.1186/s12881-019-0812-0.
80. Shariff MZ, Curras-Martin D, Campbell N, Gupta V, Mikhail JD, Levitt MJ, Hossain MA. Carcinoid tumor of lung and BRCA mutation: a case report. *J Med Case Rep*. 2019 May 1;13(1):132. doi: 10.1186/s13256-019-2052-5.
81. Kim G, Kim J, Han SY, Hwang IG, Kim HS, Min H. The effects of BRCA1 expression on the chemosensitivity of gastric cancer cells to platinum agents. *Oncol Lett*. 2019 Jun;17(6):5023-5029. doi: 10.3892/ol.2019.10169.
82. Oh M, Alkhushaym N, Fallatah S, Althagafi A, et al. The association of BRCA1 and BRCA2 mutations with prostate cancer risk, frequency, and mortality: A meta-analysis. *Prostate*. 2019;79 (8): 880-895.
83. Mok Oh, Ali McBride, Seongseok Yun, et al. BRCA1 and BRCA2 Gene Mutations and Colorectal Cancer Risk: Systematic Review and Meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* . 2018;110 (11):1178-1189.

84. Phelan CM, Iqbal J, Lynch HT, et al. Incidence of colorectal cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from a follow-up study. *Br J Cancer*. 2014, 21;110(2): 530-4.
85. Russo A, Saide A, Smaldone S, Faraonio R, Russo G. Role of uL3 in Multidrug Resistance in p53-Mutated Lung Cancer Cells. *Int J Mol Sci*. 2017 Mar 3;18(3). pii: E547. doi: 10.3390/ijms18030547.
86. Lo YL, Liu Y. Reversing multidrug resistance in Caco-2 by silencing MDR1, MRP1, MRP2, and BCL-2/BCL-xL using liposomal antisense oligonucleotides. *PLoS One*. 2014 Mar 17;9(3):e90180. doi: 10.1371/journal.pone.0090180. eCollection 2014. Erratum in: *PLoS One*. 2014;9(11):e112604.
87. Hernandez Borrero LJ, Sikder R, Lulla A, et al. Bcl-2 protein targeting by the p53/p21 complex—letter. *Cancer Res* 2018;78:2770–1.
88. Kim EM, Park JK, Hwang SG, et al. Nuclear and cytoplasmic p53 suppress cell invasion by inhibiting respiratory complex-I activity via Bcl-2 family proteins. *Oncotarget* 2014;5:8452–65.
89. Mohapatra P, Preet R, Das D, et al. Quinacrine-mediated autophagy and apoptosis in colon cancer cells is through a p53- and p21-dependent mechanism. *Oncol Res* 2012;20:81–91.
90. Russo A, Saide A, Smaldone S, Faraonio R, Russo G. Role of uL3 in Multidrug Resistance in p53-Mutated Lung Cancer Cells. *Int J Mol Sci*. 2017 Mar 3;18(3). pii: E547. doi: 10.3390/ijms18030547.
91. Jakob C., Liersch T., Meyer W. et al. Predictive value of Ki67 and p53 in locally advanced rectal cancer: Correlation with thymidylate synthase and histopathological tumor regression after neoadjuvant 5-FU-based chemoradiotherapy. *World J Gastroenterol* 2008;14: 1060–6.
92. Mizuho Nakayama , Masanobu Oshima. Mutant p53 in colon cancer. *J Mol Cell Biol*, 2019, 1;11(4):267-276.

93. Alexandrova E.M., Yallowitz A.R., Li D., et al. Improving survival by exploiting tumour dependence on stabilized mutant p53 for treatment. *Nature*, 2015; 523: 352–356.
94. Xiao-Lan Li, Jianbiao Zhou, Zhi-Rong Chen, and Wee-Joo Chng. p53 mutations in colorectal cancer- molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. *World J Gastroenterol*. 2015 Jan 7; 21(1): 84–93.
95. Tsou SH, Hou MH, Hsu LC, Chen TM, Chen YH. Gain-of-function p53 mutant with 21-bp deletion confers susceptibility to multidrug resistance in MCF-7 cells. *Int J Mol Med*. 2016 Jan;37(1):233-42. doi: 10.3892/ijmm.2015.2406. Epub 2015 Nov 11. PubMed PMID: 26572087.
96. Vancsik T, Forika G, Balogh A, Kiss E, Krenacs T. Modulated electro-hyperthermia induced p53 driven apoptosis and cell cycle arrest additively support doxorubicin chemotherapy of colorectal cancer in vitro. *Cancer Med*. 2019 Jun 10. doi: 10.1002/cam4.2330.
97. Lu-Lu Wang¹, Hui-Hui Guo¹, Yun Zhan, et al. Specific up-regulation of p21 by a small active RNA sequence suppresses human colorectal cancer growth. *Oncotarget*. 2017; 8:25055-25065.
98. Song B, Wang W, Zheng Y, Yang J, Xu Z. P21-activated kinase 1 and 4 were associated with colorectal cancer metastasis and infiltration. *Journal of Surgical Research*. 2015; 196:130–5.
99. Sulzyc-Bielicka V, Domagala P, Urasinska E, Bielicki D, Safranow K, Domagala W. Expression of p21(WAF1) in Astler-Coller stage B2 colorectal cancer is associated with survival benefit from 5FU-based adjuvant chemotherapy. *Virchows Archiv*. 2011; 458:431–8.
100. Liu W, Dai QS, Lu N, Wei LB, Ha J, Rong JJ, Mu R, You QD, Li ZY, Guo QL. LYG-202 inhibits the proliferation of human colorectal carcinoma HCT-116 cells through induction of G1/S cell cycle arrest and apoptosis via p53 and p21(WAF1/Cip1) expression. *Biochemistry and Cell Biology*. 2011; 89:287–98.

101. Phalke S, Mzoughi S, Bezzi M, Jennifer N, Mok WC, Low DHP, Thike AA, Kuznetsov VA, Tan PH, Voorhoeve PM, Guccione E. p53-Independent regulation of p21Waf1/Cip1 expression and senescence by PRMT6. *Nucleic Acids Research*. 2012; 40:9534–42.
102. Ying Zhu, Jianzhong Wu, Shuchun Li, Rong Ma. The Function Role of miR-181a in Chemosensitivity to Adriamycin by Targeting Bcl-2 in Low-Invasive Breast Cancer Cells, *Cellular Physiology and Biochemistry*, 32(5): December 2013: 1225-1237.
103. Qi Huang, Shu Li, Pu Cheng, Mei Deng, et al. High expression of anti-apoptotic protein Bcl-2 is a good prognostic factor in colorectal cancer: Result of a meta-analysis. *World J Gastroenterol*. 2017 Jul 21; 23(27): 5018–5033.
104. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15:49–63.
105. Melincovici CS, Mihu CM, Mărginean M, Boşca AB, Coneac A, Moldovan I, Crişan M. The prognostic significance of p53, Bax, Bcl-2 and cyclin E protein overexpression in colon cancer - an immunohistochemical study using the tissue microarray technique. *Rom J Morphol Embryol*. 2016;57:81–89.
106. Fucini C, Messerini L, Saieva C, Orzalesi L, Carroni V, Bartolini N. Apoptotic proteins as prognostic markers and indicators of radiochemosensitivity in stage II/III rectal cancers. *Colorectal Dis*. 2012;14:e64–e71.
107. Horisberger K, et al. Topoisomerase I expression correlates to response to neoadjuvant irinotecan-based chemoradiation in rectal cancer. *Anti-Cancer Drugs*. 2009;20(6): 519–24.
108. Canela A, Maman Y, Huang SN, Wutz G, Tang W, Zagnoli-Vieira G, Callen E, Wong N, Day A, Peters JM, Caldecott KW, Pommier Y, Nussenzweig A. Topoisomerase II-Induced Chromosome Breakage and Translocation Is Determined by Chromosome Architecture and Transcriptional Activity. *Mol Cell*. 2019 Jun 4. pii: S1097-2765(19)30322-3. doi: 10.1016/j.molcel.2019.04.030.

109. Iwai T, Sugimoto M, Wakita D, Yorozu K, Kurasawa M, Yamamoto K. Topoisomerase I inhibitor, irinotecan, depletes regulatory T cells and up-regulates MHC class I and PD-L1 expression, resulting in a supra-additive antitumor effect when combined with anti-PD-L1 antibodies. *Oncotarget*. 2018; 31;9(59):31411-31421.
110. Marchand C, Antony S, Kohn KW, et al: A novel norindenoisoquinoline structure reveals a common interfacial inhibitor paradigm for ternary trapping of the topoisomerase I-DNA covalent complex. *Mol Cancer Ther*. 5:287–295. 2006.
111. Sirikantaramas S, Yamazaki M and Saito K: Mutations in topoisomerase I as a self-resistance mechanism coevolved with the production of the anticancer alkaloid camptothecin in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008. 105:6782–6786.
112. Shaojun C, Li H, Haixin H, Guisheng L. Expression of topoisomerase 1 and carboxylesterase 2 correlates with irinotecan treatment response in metastatic colorectal cancer. *Cancer Biol Ther*. 2018;19(3):153–9.
113. Deraco M, Cabras A, Baratti D, Kusamura S. Immunohistochemical evaluation of Minichromosome maintenance protein 7 (MCM7), topoisomerase IIalpha, and Ki-67 in diffuse malignant peritoneal mesothelioma patients using tissue microarray. *Ann Surg Oncol*. 2015;22(13):4344–51.
114. An X, Xu F, Luo R, Zheng Q, Lu J, Yang Y, Qin T, Yuan Z, Shi Y, Jiang W, et al. The prognostic significance of topoisomerase II alpha protein in early stage luminal breast cancer. *BMC Cancer*. 2018;18(1):331.
115. Hendricks, A., Gieseler, F., Nazzal, S. *et al*. Prognostic relevance of topoisomerase II α and minichromosome maintenance protein 6 expression in colorectal cancer. *BMC Cancer* 19, 429 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5631-3>.
116. Kawashima A, Takayama H, Tsuyimura A. A review of ERCC1 gene in bladder cancer: implications for carcinogenesis and resistance to

chemoradiotherapy. *Adv. Urol.* 2012; 2012:812398. Epub. 2011, Oct 26 PMID:22110495.

117. Ligia Cebotaru C, Zenovia Antone N, Diana Olteanu E, Bejinariu N, Buiga R, Todor N, Ioana Iancu D, Eliade Ciuleanu T, Nagy V. A phase II single institution single arm prospective study with paclitaxel, ifosfamide and cisplatin (TIP) as first-line chemotherapy in high-risk germ cell tumor patients with more than ten years follow-up and retrospective correlation with ERCC1, Topoisomerase 1, 2A, p53 and HER-2 expression. *J BUON.* 2016;21(3):698-708.

118. Liao WY, Ho CC, Tsai TH, Chen KY, Shih JY, Yu CJ. Combined effect of ERCC1 and ERCC2 polymorphisms on overall survival in non-squamous non-small-cell lung cancer patients treated with first-line pemetrexed/platinum. *Lung Cancer.* 2018;118:90-96.

119. Chen J, Sun N, Hu G, Chen X, Jiang J, Wu H, Luo G. Association of ERCC1 Polymorphisms with the Risk of Colorectal Cancer: A Meta-Analysis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2017; 27(3): 267-275.

120. Baek, Moo-Jun. ERCC1 and the Prognosis for Patients With Colon Cancer Receiving Oxaliplatin-Based Adjuvant Chemotherapy. *Annals of coloproctology*, 2015; 31,3: 81. doi:10.3393/ac.2015.31.3.81

121. Kim CY, Seo SH, An MS, Kim KH, Hwang JW, Kim JH, et al. ERCC1 as a predictive marker for FOLFOX chemotherapy in an adjuvant setting. *Ann Coloproctol.* 2015;31:92–97.

122. Obiedat H, Alrabadi N, Sultan E, Al Shatti M, Zihlif M. The effect of ERCC1 and ERCC2 gene polymorphisms on response to cisplatin based therapy in osteosarcoma patients. *BMC Med Genet.* 2018; 6;19(1):112.

123. Ahmed N, Abubaker K, Findlay J, Quinn M. Epithelial mesenchymal transition and cancer stem cell-like phenotypes facilitate chemoresistance in recurrent ovarian cancer. *Curr Cancer Drug Targets.* 2010; 10(3): 268–78.

124. Singh A, Settleman J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene* 2010; 29: 4741–51.

125. Bowen Du and Joong Sup Shim. Targeting Epithelial–Mesenchymal Transition (EMT) to Overcome Drug Resistance in Cancer. *Molecules* 2016, 21, 965; doi:10.3390/molecules21070965
126. Park YY, An CH, Oh ST, Chang ED, Lee J. Expression of CD133 is associated with poor prognosis in stage II colorectal carcinoma. *Medicine (Baltimore)*. 2019;98(32):e16709. doi:10.1097/MD.00000000000016709
127. Horst D, Kriegl L, Engel J, et al. CD133 expression is an independent prognostic marker for low survival in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2008;99:1285–9.
128. Takahashi S, Kamiyama T, Tomaru U, et al. Frequency and pattern of expression of the stem cell marker CD133 have strong prognostic effect on the surgical outcome of colorectal cancer patients. *Oncol Rep* 2010;24:1201–12.
129. Lee HH, Seo KJ, An CH, et al. CD133 expression is correlated with chemoresistance and early recurrence of gastric cancer. *J Surg Oncol* 2012;106:999–1004.
130. Jao SW, Chen SF, Lin YS, et al. Cytoplasmic CD133 expression is a reliable prognostic indicator of tumor regression after neoadjuvant concurrent chemoradiotherapy in patients with rectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2012;19:3432–40.
131. de Sousa e Melo F, Kurtova AV, Hamoss JM, et al. A distinct role for Lgr5+stem cells in primary and metastatic colon cancer. *Nature*. 2017; 543(7647): 676-680.
132. Zheng H, Pomyen Y, Hernandez MO, et al. Single-cell analysis reveals cancer stem cell heterogeneity in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2018; 68(1): 127-140.
133. Грабовой А.Н., Савчин Т.М., Антонюк С.А., Тарасова Т.А. Экспрессия CD44 в аденокарциномах толстой кишки. *КЛИНИЧЕСКАЯ ОНКОЛОГИЯ*, No 3 (23), 2016: 1-4
134. Pingping Zhu and Zusen Fan. Cancer stem cells and tumorigenesis. *Biophys Rep*. 2018; 4(4): 178–188.
135. Takebe N, Harris PJ, Warren RQ, Ivy SP. Targeting cancer stem cells by inhibiting Wnt, Notch, and Hedgehog pathways. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011; 8: 97–106.

136. Adriana Albini, Antonino Bruno, Cristina Gallo, et al. Cancer stem cells and the tumor microenvironment: interplay in tumor heterogeneity. Connect Tissue Res. 2015; 3; 56(5): 414–425.
137. van Roy F, Berx G .The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. Cell Mol Life Sci. 2008 Nov; 65(23):3756-88.
138. Niki Christou, Aur lie Perraud, Sabrina Blondy, Marie-Odile Jauberteau, Serge Battu, and Muriel Mathonnet E-cadherin: A potential biomarker of colorectal cancer prognosis Oncol Lett. 2017 Jun; 13(6): 4571–4576.
139. Shen Y, Hirsch DS, Sasiela CA, Wu WJ. Cdc42 Regulates E-cadherin ubiquitination and degradation through an epidermal growth factor receptor to Src-mediated pathway. J Biol Chem. 2008;283:5127–5137.
140. Soluble serum E-cadherin as a marker of tumour progression in colorectal cancer patients. Wilmanns C, Grossmann J, Steinhauer S, Manthey G, Weinhold B, Schmitt-Gr ff A, von Specht BU. Clin Exp Metastasis. 2004; 21(1):75-8.
141. Clinical significance of serum soluble E-cadherin in colorectal carcinoma. Okugawa Y, Toiyama Y, Inoue Y, Iwata T, Fujikawa H, Saigusa S, Konishi N, Tanaka K, Uchida K, Kusunoki M J Surg Res. 2012; 15; 175(2):67-73.
142. Cao H, Xu E, Liu H, Wan L, Lai M Epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer metastasis: A system review. Pathol Res Pract. 2015; 211(8):557-69.
143. Wang R, Ma X, Li Y, He Y, Huang D, Cai S, Peng J. The Characteristics and Prognostic Effect of E-Cadherin Expression in Colorectal Signet Ring Cell Carcinoma. PLoS One. 2016; 11(8):e0160527.
144. Liu S, Barry EL, Baron JA, Rutherford RE, Seabrook ME, Bostick RM Effects of supplemental calcium and vitamin D on the APC/ β -catenin pathway in the normal colorectal mucosa of colorectal adenoma patients. Mol Carcinog. 2017; 56(2):412-424.

145. Nishioka M, Ueno K, Hazama S, Okada T, et al.: Possible involvement of Wnt11 in colorectal cancer progression. *Molecular Carcinogenesis*, 2013; 52: 207-217.
146. Kruck S, Eyrich C, Scharpf M, et al.: Impact of an altered Wnt1/ β -catenin expression on clinicopathology and prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *Int J Mol Sci*, 2013; 14: 10944-10957.
147. Umbreit C, Flanjak J, Weiss C, et al.: Incomplete Epithelial–Mesenchymal Transition in p-16 positive squamous cell carcinoma cells correlates with β -catenin expression. *Anticancer Res* 34: 7061-7070, 2014.
148. N.Yoshida, T.Kinugasa, K.Ohshima et al. Analysis of Wnt and β -catenin Expression in Advanced Colorectal Cancer. *Anticancer Research* August 2015 vol. 35 no. 8 4403-4410.
149. Федянин М. Ю., Хмелькова Д. Н., Серебрянская Т. С., Никольская Т. А., Тюляндин С. А. Стволовые опухолевые клетки рака толстой кишки. *Злокачественные опухоли*, 2015; № 4, спецвыпуск 2: 71–81.
150. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009; 139: 871–890.
151. Hao Y, Baker D, Ten Dijke P. TGF- β -Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Metastasis. *Int J Mol Sci*. 2019, 5; 20(11). pii: E2767. doi: 10.3390/ijms20112767.
152. Wang C, Shao L, Pan C, Ye J, Ding Z, Wu J, Du Q, Ren Y, Zhu C. Elevated level of mitochondrial reactive oxygen species via fatty acid β -oxidation in cancer stem cells promotes cancer metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition. *Stem Cell Res Ther*. 2019; 13;10(1):175. doi: 10.1186/s13287-019-1265-2. PubMed PMID: 31196164.
153. A.Sadanandam, C.A.Lyssiottis, K.Homicsko et al. A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy. *Nat. Med.*, 2013; 5 (19): 619-25.

154. Шубин В.П., Шелыгин Ю.А., Сушков О.И., Цуканов А.С. Роль эпителиально-мезенхимального перехода в развитии коло ректального рака (обзор литературы). Колопроктология. 2018;(2):111-117.
155. F.Ma, W.Li, W.Liu et al. MiR-23a promotes TGF- β 1 induced EMT and tumor metastasis in breast cancer cells by directlytargeting CDH1 and activating Wnt/ β -catenin signaling. Oncotarget, 2017; 4 (18): 69538-69550.
156. В.Є.Жильчук, Н.Ю.Лук'янова, Н.О.Бездєнежних, А.Л.Воронцова. Особливості експресії молекулярних маркерів в пухлинних клітинах молочної залози під впливом інтерферону-альфа. Патологія. 2009; 6 (2): 50-53.
157. Yu.I. Kudryavets, N.O. Bezdenezhnykh, O.O. Lykhova, N.I. Semesiuk, A.L. Vorontsova. The role of interferon as a modifier of epithelial -mesenchymal transition in tumor cells. Exp Oncol. - 2011; 33 (3): 178–181.
158. А.Л.Воронцова, Ю.И.Кудрявец, В.Е.Жильчук, Н.А.Бездєнежных. Экспериментальное и клиническое исследование эффективности интерферона при онкопатологии. Здоровье женщины. 2009; 7: 62-66.
159. В.Ф.Чехун, Г.І.Максим'як, В.Є.Жильчук, А.Л.Воронцова, Н.О.Бездєнежних, Ю.Й.Кудрявец. Шляхи вдосконалення медикаментозної терапії хворих на рак прямої кишки з метастазами в печінку: переваги метрономного режиму хіміотерапії. Онкологія 2011; 13 (3): 229-233.
160. Fender AW, Nutter JM, Fitzgerald TL, Bertrand FE, Sigounas G. Notch-1 promotes stemness and epithelial to mesenchymal transition in colorectal cancer. J Cell Biochem. 2015;116:2517–27.
161. Yang J., Weinberg R.A. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. Dev. Cell. 2008; 14: 818-829.
162. Эллиниди ВН, Аникеева НА, Максимова НА. Практическая иммуноцитохимия (методические рекомендации).Петербург: ВЦЭРМ МЧС РФ. 2002:36.
163. Гланц. С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц.. – М.: Практика, 1998. – 459 с.

164. Hosmer D. W. Applied Logistic Regression / D. W. Hosmer, S. Lemeshow. – USA: Wiley, 2013. – 527 с.

165. Н.О. Безденежних, В. Є. Жильчук, М. В. Глянько, І. М. Адаменко, Ю. Й. Кудрявець. Експресія в пухлинних клітинах маркерів епітеліально-мезенхімального переходу та білків лікарської стійкості в якості прогностичного показника у хворих на колоректальний рак / Онкологія. – 2016; 18, (1): 48-54.

166. Ю.Й. Кудрявець, Н.О. Безденежних, Н.І. Семесюк, А.В. Жильчук, О.О. Лихова, О.А. Ковальова, А.Л. Воронцова, В.Є. Жильчук, М.В. Глянько, Ю.В. Жильчук, Р.А. Кочерга. Мікрооточення пухлинних клітин як джерело модифікаторів епітеліально-мезенхімального переходу та мішеней для персоналізованої терапії / Онкологія 2016; 18 (4): 269-276.

167. Glyanko M., Bezdeniezhnykh N., Zhylchuk V., Kudryavets Yu. Markers of epithelial-mesenchymal transition and drug resistance in tumors of patient with colorectal cancer. 7 th International Scientific Interdisciplinary Conference for medical students and young scientists, Kharkiv, Ukrain. - May 15-16, 2014.

168. Глянько М.В., Безденежных Н.А., Жильчук В.Е., Кудрявец Ю.И., Адаменко И.Н. Информативность маркеров лекарственной устойчивости с белками адгезии клеток как потенциального прогностического комплекса течения опухолевого процесса у больных колоректальным раком. "Внесок молодих вчених і спеціалістів у розвиток медичної науки і практики: нові перспективи", 15.05.15, Харків: С.30.

169. Максимьяк Г.И., Жильчук В.Е., Жильчук А.В., Чишкевич Ю.В., Кудрявец Ю.Й., Воронцова А.Й., Безденежных Н.А., Глянько М.В., Николаенко А.Н., Дземан М.И. Эффективность препарата Эрбисол Ультрафарм в комплексном лечении пациентов с метастатическими поражениями печени. «Eurasian Journal of Oncology», 2016, volume 4, № 3: 696 – 709.

170. Глянько М.В., Безденежных Н.А., Кудрявец Ю.И., Максимьяк Г.И., Жильчук А.В., Жильчук В.Е. Оценка наиболее информативных маркеров

у больных колоректальным раком путем моделирования прогностической модели для определения вероятности прогрессирования заболевания / "Онкологический журнал общественного объединения "Белорусское общество онкологов"" - 2017 - 1 (11): 13-20.

171. М.В. Глянько, А.В. Жильчук, В.Е. Жильчук, Ю.И. Кудрявец, Г.И. Максимяк. Выбор схемы терапевтического лечения с использованием маркеров чувствительности у больных колоректальным раком – Онкология 2017 – 19 (2): 141 – 144.

172. Glyanko Mikhail, Bezdieniezhnykh Natalia, Kudryavets Yuri, Lykhova Alexandra, Zhylchuk Victor, and ather. Assessment of prognostic significance of E-cadherin and ERCC1 expression in colorectal cancer. JPPRI . July 2017 Vol.:9, Issue:9. P 31-38.

173. М.В.Глянько. Індивідуалізація в лікуванні хворих на коло ректальний рак з урахуванням фенотипових особливостей пухлинних клітин. Науково практична конференція, Рівне, Україна, 18-19 жовтня, 2018р.

174. Диссертация на соискание степени кандидата медицинских наук. Индивидуализированная химиотерапия больных с диссеминированным колоректальным раком на основе предиктивных маркеров противоопухолевой терапии. Зорина Е.Ю. 2014, Санкт-Петербург – 143 с.

175. Е. Ю. Зорина, Р. В. Орлова. Прогностические факторы опухолевого процесса у больных диссеминированным колоректальным раком. Онкологическая колопроктология – 2014, 2: 33-40.

176. Duffy MJ. Personalized treatment for patients with colorectal cancer: role of biomarkers. Biomark Med. 2015;9(4): 337-47.

177. Jonas Leichsenring, Adriane Koppelle, and Anke Reinacher-Schick. Colorectal Cancer: Personalized Therapy. Gastrointest Tumors. 2014; 1(4): 209–220.

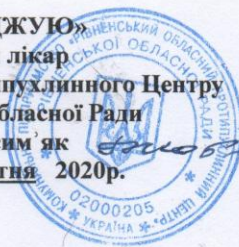
178. Donna M. Graham, Vicky M. Coyle, Richard D. Kennedy, Richard H. Wilson. Molecular Subtypes and Personalized Therapy in Metastatic Colorectal Cancer. Current Colorectal Cancer Reports 2016; 12 (3): 141–150.

179. Frank A. Sinicrope, Koichi Okamoto, Pashtoon M. Kasi, Hisato Kawakami. Molecular Biomarkers in the Personalized Treatment of Colorectal Cancer *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2016; 14 (5): 651–658.
180. А.П. Колесник, И.Д. Паламарчук, А.М. Сидоренко. Молекулярные маркеры прогрессирования колоректального рака. *Онкология* – 2006, 8 (1): 13-17.
181. Dienstmann R, Salazar R, Tabernero J. Personalizing colon cancer adjuvant therapy: selecting optimal treatments for individual patients. *J Clin Oncol.* 2015; 33:1787-96.
182. Grothey A, Goldberg RM. A review of oxaliplatin and its clinical use in colorectal cancer. *Expert. Opin. Pharmacother* 2004; 5: 2159–70.
183. Marsh S. Pharmacogenetics of colorectal cancer. *Expert. Opin. Pharmacother.* 2005; 6: 2607–16.
184. Iwatsuki M, Mimori K, Yokobori T, et al. A platinum agent resistance gene, POLB, is a prognostic indicator in colorectal cancer. *J. Surg Oncol* 2009; 1: 261-6.
185. Поповская ТН. Перспективные подходы к лекарственной терапии онкологических больных с участием молекулярно-генетических характеристик опухоли. *Международный мед ж* 2006; 4: 126-32.
186. Л.П.Швачко, О.П.Холод. Епітеліально-мезенхімальна трансформація в канцерогенезі. *Онкология* 2014, 16 (1): 4 – 12.
187. Yang AD. Chronic oxaliplatin resistance induces epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 4147–53.
188. Zheng HX, Cai YD, Wang YD, et al. Fas signaling promotes motility and metastasis through epithelial–mesenchymal transition in gastrointestinal cancer. *Oncogene* 2013; 32: 1183-92.

189. Hoshino H, Miyoshi N, Nagai K, et al. Epithelial–mesenchymal transition with expression of SNAI1-induced chemoresistance in colorectal cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 390: 1061-5.
190. Papageorgis P, Cheng K, Ozturk S, et al. Smad4 inactivation promotes malignancy and drug resistance of colon cancer. *Cancer Res* 2011; 71: 998–1008.
191. Cao H, Xu E, Liu H, et al. Epithelial–mesenchymal transition in colorectal cancer metastasis: A system review. *Pathology – Res and Practice* 2015; 211: 557–69.
192. Custodio A., Feliu J. Prognostic and predictive biomarkers for epidermal growth factor receptor targeted therapy in colorectal cancer: beyond Kras mutations. *Critical Reviews in oncology/hematology*. 2013; 85: 45-81.
193. Jonas Leichsenring, Adriane Koppelle, and Anke Reinacher-Schick. Colorectal Cancer: Personalized Therapy. *Gastrointest Tumors*. 2014; 1(4): 209–220.
194. Silvestri A., Pin E., Huijbers A. et al. Individualized therapy for metastatic colorectal cancer. *Journal of internal medicine*. 2013.

ДОДАТОК А

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
Головний лікар
Рівненського обласного протипухлинного Центру
Рівненської обласної Ради
Г.І. Максим'як
«15» Квітня 2020р.



АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва пропозиції для впровадження:

Індивідуалізація лікування хворих на рак прямої кишки із врахуванням експресії біомаркерів, котрі асоційовані із медикаментозною резистентністю та злоякісністю пухлин.

2. Ким запропоновано, адреса виконавця:

03022, м. Київ, вул. Васильківська 45, Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.С. Кавецького НАН України;

Виконавці: Глянько М.В., Жильчук В.Є., Кудрявець Ю.Й., Безденежних Н.О.

3. Джерела інформації:

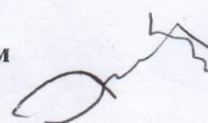
1. М.В. Глянько, А.В. Жильчук, В.Е. Жильчук, Ю.И. Кудрявець, Г.И. Максим'як. Выбор схемы терапевтического лечения с использованием маркеров чувствительности у больных колоректальным раком – Онкология 2017 – 19 (2): 141 – 144.

2. Glyanko M., Bezdeniezhnykh N., Zhylchuk V., Kudryavets Yu. Markers of epithelial-mesenchymal transition and drug resistance in tumors of patient with colorectal cancer. 7 th International Scientific Interdisciplinary Conference for medical students and young scientists, Kharkiv, Ukrain. - May 15-16, 2014.

3. Glyanko Mikhail, Bezdeniezhnykh Natalia, Kudryavets Yuri, Lykhova Alexandra, Zhylchuk Victor, and other. Assessment of prognostic significance of E-cadherin and ERCC1 expression in colorectal cancer. JPPRI . July 2017 Vol.:9, Issue:9. P 31-38.

4. **Де було впроваджено:** КП«Рівненський обласний протипухлинний Центр» Рівненської обласної Ради.

Зав. проктологічним відділенням

 В.Є. Жильчук

ЗАТВЕРДЖУЮ:
 Головний лікар
 КЛПУ «міський онкологічний диспансер
 м.Краматорська»
 О.І. ПТИЦЯ
 «14» 200/14 р



АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва пропозиції для впровадження:

Індивідуалізація лікування хворих на рак прямої кишки із врахуванням експресії біомаркерів, котрі асоційовані із медикаментозною резистентністю та злоякісністю пухлин.

2. Ким запропоновано, адреса виконавця:

03022, м. Київ, вул. Васильківська 45, Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.С. Кавецького НАН України;

Виконавці: Глянько М.В., Жильчук В.Є., Кудрявець Ю.Й., Безденєжних Н.О.

3. Джерела інформації:

1. М.В. Глянько, А.В. Жильчук, В.Є. Жильчук, Ю.И. Кудрявець, Г.И. Максимяк. Выбор схемы терапевтического лечения с использованием маркеров чувствительности у больных колоректальным раком – Онкология 2017 – 19 (2): 141 – 144.

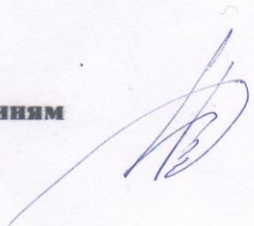
2. Glyanko M., Bezdeniezhnykh N., Zhylchuk V., Kudryavets Yu. Markers of epithelial-mesenchymal transition and drug resistance in tumors of patient with colorectal cancer. 7 th International Scientific Interdisciplinary Conference for medical students and young scientists, Kharkiv, Ukrain. - May 15-16, 2014.

3. Glyanko Mikhail, Bezdeniezhnykh Natalia, Kudryavets Yuri, Lykhova Alexandra, Zhylchuk Victor, and ather. Assessment of prognostic significance of E-cadherin and ERCC1 expression in colorectal cancer. JPPRI . July 2017 Vol.:9, Issue:9. P 31-38.

4. Де було впроваджено: КЛПУ «міський онкологічний диспансер м.Краматорськ»

Зав. хіміотерапевтичним відділенням

Нікулін Р.В.





«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Головний лікар

Львівського державного онкологічного
регіонально лікувально-діагностичного центру

І.В. Ковальчук

«03» Березня 2020р.

АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва пропозиції для впровадження:

Індивідуалізація лікування хворих на рак прямої кишки із врахуванням експресії біомаркерів, котрі асоційовані із медикаментозною резистентністю та злоякісністю пухлин.

2. Ким запропоновано, адреса виконавця:

03022, м. Київ, вул. Васильківська 45, Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України;

Виконавці: Глянько М.В., Жильчук В.Є., Кудрявець Ю.Й., Бездєнєжних Н.О.

3. Джерела інформації:

1. М.В. Глянько, А.В. Жильчук, В.Є. Жильчук, Ю.И. Кудрявець, Г.И. Максимяк. Выбор схемы терапевтического лечения с использованием маркеров чувствительности у больных колоректальным раком – Онкология 2017 – 19 (2): 141 – 144.

2. Glyanko M., Bezdienieznykh N., Zhylchuk V., Kudryavets Yu. Markers of epithelial-mesenchymal transition and drug resistance in tumors of patient with colorectal cancer. 7 th International Scientific Interdisciplinary Conference for medical students and young scientists, Kharkiv, Ukrain. - May 15-16, 2014.

3. Glyanko Mikhail, Bezdienieznykh Natalia, Kudryavets Yuri, Lykhova Alexandra, Zhylchuk Victor, and ather. Assessment of prognostic significance of E-cadherin and ERCC1 expression in colorectal cancer. JPPRI . July 2017 Vol.:9, Issue:9. P 31-38.

4. **Де було впроваджено:** «Львівський державний онкологічний регіональний лікувально-діагностичний центр».

Зав. хіміотерапевтичного відділення

Я.В. Шпарик

ЗАТВЕРДЖУЮ
Генеральний директор
КНП «Прикарпатський клінічний
онкологічний центр»
Івано-Франківської обласної Ради
В.Р. Романчук
«05» лютого 2020р.



АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва пропозиції для впровадження:

Індивідуалізація лікування хворих на рак прямої кишки із врахуванням експресії біомаркерів, котрі асоційовані із медикаментозною резистентністю та злоякісністю пухлин.

2. Ким запропоновано, адреса виконавця:

03022, м. Київ, вул. Васильківська 45, Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України;

Виконавці: Глянько М.В., Жильчук В.Є. Кудрявець Ю.Й, Безденежних Н.О.,

3. Джерела інформації

1. М.В. Глянько, А.В. Жильчук, В.Е. Жильчук, Ю.И. Кудрявець, Г.И. Максимьяк. Выбор схемы терапевтического лечения с использованием маркеров чувствительности у больных колоректальным раком – Онкология 2017 – 19 (2): 141 – 144.

2. Glyanko M., Bezdeniezhnykh N., Zhylchuk V., Kudryavets Yu. Markers of epithelial-mesenchymal transition and drug resistance in tumors of patient with colorectal cancer. 7 th International Scientific Interdisciplinary Conference for medical students and young scientists, Kharkiv, Ukrain. - May 15-16, 2014.

3. Glyanko Mikhail, Bezdeniezhnykh Natalia, Kudryavets Yuri, Lykhova Alexandra, Zhylchuk Victor, and other. Assessment of prognostic significance of E-cadherin and ERCC1 expression in colorectal cancer. JPPRI . July 2017 Vol.:9, Issue:9. P 31-38.

4. **Де було впроваджено:** КНП «Прикарпатський клінічний онкологічний центр» Івано –Франківської обласної Ради.

Зав. хіміотерапевтичного відділення

С.С. Горошко

ДОДАТОК Б

Список публікацій здобувача

1. Н. О. Безденежных, В. Є. Жильчук, М. В. Глянько, І. М. Адаменко, Ю. Й. Кудрявец. Експресія в пухлинних клітинах маркерів епітеліально-мезенхімального переходу та білків лікарської стійкості в якості прогностичного показника у хворих на колоректальний рак / Онкологія. – 2016; 18, (1): 48-54. (Глянько М.В. - аналіз літературних джерел за темою дослідження, підготовка зразків для імуногістохімічного дослідження, участь у оформленні статті).
2. Ю.Й. Кудрявец, Н.О. Безденежных, Н.І. Семесюк, А.В. Жильчук, О.О. Лихова, О.А. Ковальова, А.Л. Воронцова, В.Є. Жильчук, М.В. Глянько, Ю.В. Жильчук, Р.А. Кочерга. Мікрооточення пухлинних клітин як джерело модифікаторів епітеліально-мезенхімального переходу та мішеней для персоналізованої терапії / Онкологія 2016; 18 (4): 269-276. (Глянько М.В. - аналіз вітчизняної та зарубіжної літератури за темою дослідження, узагальнення наведених в них даних, участь у написанні статті).
3. Максимьяк Г.И., Жильчук В.Е., Жильчук А.В., Чишкевич Ю.В., Кудрявец Ю.Й., Воронцова А.Й., Безденежных Н.А., Глянько М.В., Николаенко А.Н., Дземан М.И. Эффективность препарата Эрбисол Ультрафарм в комплексном лечении пациентов с метастатическими поражениями печени. «Eurasian Journal of Oncology», 2016, volume 4, № 3: 696 – 709. (Глянько М.В. - аналіз вітчизняної та зарубіжної літератури за темою дослідження, клінічні спостереження, опрацювання клінічних результатів, участь у написанні статті).
4. Глянько М.В., Безденежных Н.А., Кудрявец Ю.И., Максимьяк Г.И., Жильчук А.В., Жильчук В.Е. Оценка наиболее информативных маркеров у больных колоректальным раком путем моделирования прогностической модели для определения вероятности прогрессирования заболевания /

"Онкологический журнал общественного объединения "Белорусское общество онкологов"" - 2017 - 1 (11): 13-20. (Глянько М.В. - *аналіз літературних джерел за темою дослідження, підготовка зразків для імуногістохімічного дослідження, аналіз та узагальнення статистичних даних, участь у оформленні статті*).

5. М.В. Глянько, А.В. Жильчук, В.Е. Жильчук, Ю.И. Кудрявец, Г.И. Максимяк. Выбор схемы терапевтического лечения с использованием маркеров чувствительности у больных колоректальным раком – Онкология 2017 – 19 (2): 141 – 144. (Глянько М.В. - *аналіз вітчизняної та зарубіжної літератури за темою дослідження, клінічні спостереження, опрацювання клінічних результатів, участь у написанні статті*).

6. Glyanko Mikhail, Bezdniezhnykh Natalia, Kudryavets Yuri, Lykhova Alexandra, Zhylchuk Victor, and ather. Assessment of prognostic significance of E-cadherin and ERCC1 expression in colorectal cancer. JPPRI . July 2017 Vol.:9, Issue:9. P 31-38. (Глянько М.В. - *аналіз літературних джерел за темою дослідження, клінічні спостереження, підготовка зразків для імуногістохімічного дослідження, аналіз та узагальнення статистичних даних, участь у оформленні статті*).

7. Glyanko M., Bezdniezhnykh N., Zhylchuk V., Kudryavets Yu. Markers of epithelial-mesenchymal transition and drug resistance in tumors of patient with colorectal cancer. 7 th International Scientific Interdisciplinary Conference for medical students and young scientists, Kharkiv, Ukrain. - May 15-16, 2014.

8. Глянько М.В., Безденежных Н.А., Жильчук В.Е., Кудрявец Ю.И., Адаменко И.Н. Информативность маркеров лекарственной устойчивости с белками адгезии клеток как потенциального прогностического комплекса течения опухолевого процесса у больных колоректальным раком. "Внесок молодих вчених і спеціалістів у розвиток медичної науки і практики: нові перспективи", 15.05.15, Харків: С.30.

9. М.В. Глянько, В.Е. Жильчук, Ю.И. Кудрявец. Роль окремих маркерів лікарської стійкості в прогнозуванні ефективності лікування хворих на колоректальний рак платиновмісними хіміопрепаратами – Онкологія 2015 – 17 (3): 206.

Відомості про апробацію результатів дисертації

1. 7 th International Scientific Interdisciplinary Conference for medical students and young scientists (Kharkiv, 2014) - усний виступ, тези.

2. Науково-практична конференція “Внесок молодих вчених і спеціалістів у розвиток медичної науки і практики: нові перспективи” (Харків, 2015) – усний виступ, тези.

3. Науково-практична конференція “Мінімальна залишкова хвороба при солідних пухлинах (Київ, 2015) – стендовий виступ, тези.