

**ЗАСТОСУВАННЯ КОМБІНОВАНОЇ ОНКОЛІТИЧНОЇ
ВІРОТЕРАПІЇ З ТРАНСАРТЕРІАЛЬНОЮ
ХІМІОЕМБОЛІЗАЦІЄЮ ПЕЧІНКОВОЇ АРТЕРІЇ ПРИ
ГЕПАТОЦЕЛЮЛЯРНІЙ КАРЦИНОМІ В ЕКСПЕРИМЕНТІ**

ЗМІСТ

ВСТУП.....	3
РОЗДІЛ I. СУЧАСНІ МЕТОДИ ЛІКУВАННЯ ГЕПАТОЦЕЛЮЛЯРНОЇ КАРЦИНОМИ.....	6
ВЛАСНІ ДОСЛІДЖЕННЯ	
РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ, МЕТОДИ МОДЕЛЮВАННЯ ТА ЛІКУВАННЯ ГЕПАТОЦЕЛЮЛЯРНОЇ КАРЦИНОМИ НА ЩУРАХ.....	9
<i>2.1 Матеріали та методи дослідження</i>	<i>9</i>
<i>2.2. Моделювання гепатоцелюлярної карциноми.....</i>	<i>9</i>
<i>2.3. Передлікувальний етап: інструментальні методи дослідження.....</i>	<i>10</i>
<i>2.4. Лікування гепатоцелюлярної карциноми.....</i>	<i>11</i>
<i>2.5 Макро та мікроскопічні методи дослідження.....</i>	<i>16</i>
<i>2.6. Імуногістохімічний аналіз.....</i>	<i>17</i>
<i>2.7 Статистичні методи дослідження</i>	<i>18</i>
РОЗДІЛ III. ХАРАКТЕРИСТИКА РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	20
РОЗДІЛ IV. АНАЛІЗ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	24
ВИСНОВКИ.....	27
АНОТАЦІЯ	
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ГЦК – гепатоцелюлярна карцинома

ТАХЕ – транс артеріальна хіміоемболізація

ВПГ - вірус простого герпесу людини

ІХ – імуногістохімічний/імуногістохімічне (дослідження)

МФМ – морфометричні (методики)

УЗД – ультразвукове дослідження

BCLC – шкала для оцінки ступіню важкості гепатоцелюлярної карциноми

ВСТУП

Дослідження виконано автором самостійно у рамках грантової програми допомоги молодим науковцям.

Актуальність: рак печінки - п'ята за поширеністю патологія гепатобіліарної системи та друга найбільш часта причина рак-асоційованої смерті у світі. Щорічно реєструється понад 854,000 нових випадки раку печінки та 810,000 смертей, спричинених захворюванням [1]. Поряд із цим, **гепатоцелюлярна карцинома (ГЦК)** - представляє 90% від усіх первинних пухлин печінки та визнається світовою спільнотою як важлива глобальна проблема. Зважаючи на статистичні дані, рівень смертності від первинних пухлин печінки в Україні є не найвищим у Європі і складає 4,1 випадків на 100 000 населення [2]. Приміром в Італії цей показник варіюється від 6 до 6,5 випадків на 100 000 населення. Однак, спостерігається негативна тенденція до зростання рівня захворюваності та смертності, до прикладу у 2012 році рівень смертності від первинних пухлин печінки в Україні складав 1,567 на 100 000 населення. Низький рівень діагностики, велика кількість предикторів розвитку ГЦК, злоякісність процесу та складність у лікуванні - причини підвищеної уваги науковців та лікарів до проблем, пов'язаних із методами терапії ГЦК. Експерти зауважують, що за 10-15 років гепатоцелюлярна карцинома може стати найпоширенішою патологією гепатобіліарної системи, лікування якої буде ускладнене прогресуванням фонових захворювань. Згідно з європейськими рекомендаціями у лікуванні ГЦК важливою є ідентифікація стадії захворювання. За BCLC виділяють 5 стадій, для яких застосовують відповідні алгоритми лікування, серед них: оперативні втручання (резекція, трансплантація печінки, малоінвазивні оперативні маніпуляції), хіміотерапія (неoad'ювантна та ад'ювантна), імунотерапія тощо. Однак результати 5-річної виживаності й далі залишаються

невтішними. Починаючи з 2004 року у науковій спільноті ведуться активні дискусії та дослідження впливу віротерапії на канцерогенез. Так, до 2019 року вченим вдалося довести ефективність онколітичної віротерапії у лікуванні окремих видів раку, наприклад: Bluetongue virus та Measles virus (Edmonston) володіють онколітичними властивостями відносно гліом та раку яєчників. Досліджувався вплив Vaccinia virus на первинні пухлини печінки (в т.ч. гепатоцелюлярну карциному) в результаті було встановлено онколітичні властивості даного вірусу [8]. Однак, проблемними питаннями при застосуванні такої віротерапії залишаються важкі ускладнення та період реабілітації.

При цьому, **вірус простого герпесу людини (ВПГ)** як онколітик досліджується у незначній мірі, попри те, що існують перспективні результати лікування на солідних пухлинах.

Таким чином, **мета дослідження** – дослідити та порівняти вплив комбінованої онколітичної віротерапії простим вірусом герпесу людини з трансартеріальною хіміоемболізацією та інтратуморальним введенням хіміопрепарату на гепатоцелюлярну карциному у щурів.

Завдання дослідження:

1. Простежити та оцінити етапи лізису пухлини та частоту повних некрозів пухлини під контролем комп'ютерної томографії.
2. Оцінити рівень відносного росту пухлин та індексу апоптозу пухлинних клітин за допомогою TUNEL методики з використанням аналізу ANOVA з повторними вимірами.
3. Порівняти ефективність застосування віротерапії в поєднанні з трансартеріальною хіміоемболізацією та інтратуморальною хіміотерапії, за допомогою статистичного методу.

4. Оцінити імуніопосередковану відповідь пухлинних клітин гепатоцелюлярної карциноми на проведені лікування.

5. Виявити особливості дії віротерапії в поєднанні з хіміотерапією на пухлинні клітини.

Для забезпечення мети було використано наступні **матеріали та методи:**

1. Моделювання гепатоцелюлярної карциноми на тлі цирозу печінки з використанням тетрахлорметанової моделі.

2. Рандомізація щурів на чотири групи, для яких застосовано відповідні інтервенційні протоколи лікування.

3. Співвідношення росту пухлин оцінювали за допомогою комп'ютерної томографії (TOSHIBA AQUILION 16 (Японія)).

4. Для аналізу індексу апоптозу, застосували маркування за допомогою термінального кінця дезоксинуклеотидилтрансферази (дУТФ) – метод TUNEL.

5. Для розрахунку відносного росту пухлини використано дисперсійний аналіз ANOVA з повторними вимірами.

6. Для розрахунку відповіді пухлини на лікування використано критерії mRECIST.

7. Застосували критерії Фішера для статистичної перевірки гіпотези

РОЗДІЛ I

СУЧАСНІ МЕТОДИ ЛІКУВАННЯ ГЕПАТОЦЕЛЮЛЯРНОЇ КАРЦИНОМИ

Лікування гепатоцелюлярної карциноми, яка виникла на тлі цирозу печінки являє собою складне питання у виборі лікувальної тактики. Згідно з останніми рекомендаціями [4] запропоновано модифікацію BCLC класифікації з відповідними методами лікування. Так, рекомендованими методами лікування є:

на дуже ранній стадії (0) - радіочастотна абляція або резекція печінки;

на ранній стадії (A) - в залежності від фокальності запропоновані резекція печінки або її трансплантація. У випадку неможливості проведення трансплантації рекомендована абляція;

на середній стадії (B) - єдиним методом лікування вбачається хіміоемболізація. При цьому варто відмітити, що препаратом першої черги визнано Сорафеніб - інгібітор мульти-тирозинкіназ. Даний препарат відкрив двері для оцінки та досліджень інших таргетних препаратів, але зараз залишається препаратом вибору при ГЦК. Поєднання **трансартеріальної хіміоемболізації (ТАХЕ)** з хіміоемболізацією є недефективним методом лікування неоперабельних пухлин, що показує гарні віддаленні результати.

Для надважких випадків ГЦК рекомендованою є системна терапія. Попри варіабельність методів лікування, на жаль, жоден із них не забезпечує високого рівня виживаності (5-и річної), а через

дороговартісність, деякі із перелічених методів лікування, є малодоступними у нашій країні.

В останні роки провідні світові наукові лабораторії приділяють велику увагу ролі вірусів як лікувальних агентів багатьох патологій, онкологія - не є виключенням. Онколітичні віруси володіють здатністю знищувати інфіковані злоякісні клітини різними методами: від прямої вірусної цитотоксичності, тобто лізису, до низької цитотоксичної імуноефекторної діяльності. За допомогою звичайних моделей загибелі клітин (апоптоз, некроз або аутофагія) описати складні каскади реакцій “вбивства” ракових клітин під час віротерапії належним чином фактично неможливо.

Терапевтичний ефект віротерапії обумовлений тим, що онколітичний вірус, як і належить такому патогену, підкорює та контролює весь механізм запрограмованої загибелі інфікованої клітини. І, не зважаючи на те що вона ракова, тобто «безсмертна», вірус урешті-решт її вбиває, оскільки безжально експлуатує наявні клітинні ресурси для синтезу та збору нових вірусних часток [7].

Однак, використання вірусу простого герпесу людини є недостатньо дослідженим, хоча малочисленні експерименти та клінічні випробування вказують на перспективність використання ВПГ. Головним чином це можна пояснити тим, що вірус простого герпесу людини - це висококонтагіозна інфекція, яка являє собою оболонковий дволанцюговий ДНК-вірус з повністю секвестрованим геномом близько 152 кілобаз, що кодує приблизно 80 генів. Великий, добре охарактеризований геном дозволяє видаляти гени, які, як відомо, не є необхідними для реплікації в ракових клітинах (оцінюються приблизно в 30 кілобаз), що дозволяє вводити терапевтичні трансгени у вірусний каркас. Отже даний вірус може

входити в ракові клітини і реплікуватися в цитозолі, викликаючи онколіз і активацію неоантигенів, які вивільняються з лізованих ракових клітин. Така дія може викликати опосередковане злиття вірусної оболонки з клітинною мембраною пухлини та призводити до апоптозу ракових клітин.

Теоретично, онколітична віротерапія повинна бути незалежною від дози, так що навіть невеликий початковий інокулят вірусу може посилюватися в межах пермісійних ракових клітин і призводити до їх літичного руйнування. У ході дослідження автором буде з'ясовано максимально толерантну дозу віропрепарату та охарактеризовано її ефективність.

Попри перспективність методу віротерапії, **оцінки впливу герпес-вірусу людини на гепатоцелюлярну карциному, а також прикладів комбінації трансартеріальної хіміоемболізації та віротерапії першим штамом простого герпесу людини в літературі не виявлено**, таким чином, вивчення даного напряму лікування є актуальним і стало головною метою дослідження.

У попередніх абзацах ще раз підтверджується актуальність та новизна поєднання трансартеріальної хіміоемболізації та онколітичної віротерапії.

РОЗДІЛ II

МАТЕРІАЛИ, МЕТОДИ МОДЕЛЮВАННЯ ТА ЛІКУВАННЯ ГЕПАТОЦЕЛЮЛЯРНОЇ КАРЦИНОМИ НА ЩУРАХ

2.1. Матеріали та методи дослідження

Дослідження виконано автором згідно з вимогами Європейської комісії з нагляду за проведенням лабораторних та інших дослідів за участі експериментальних тварин різних видів.

У дослідженні було використано 70 самців щурів лінії Буффало 4-5 тижнів життя, масою 200-250 грам, дослідження на більш молодих щурах є ризиковим, через можливе токсичне перенасичення.

Також використано лінії клітин гепатоцелюлярної карциноми людини HuH 7, Li 7, JHN1, JHN2, які були імплантовані у печінку щурів.

Використано модель інфікування клітин ВПГ-1: клітини інфікували першим типом вірусу простого герпесу людини при множинності інфекції (MOI) = 0,01 і інкубували при 37 ° C протягом 48 годин. Титр активності вірусу визначали за допомогою Vero клітин.

2.2. Моделювання гепатоцелюлярної карциноми

На першому етапі дослідження було проведено моделювання гепатоцелюлярної карциноми на тлі цирозу на 70 щурах лінії Буффало з використанням тетрахлорметану.

Протокол моделювання був наступним: приготований 20% розчин тетрахлорметану (CCl₄) та оливкової олії впродовж 12 тижнів тричі на тиждень перорально вводився щурам. Після цього щурів було зважено та підготовано до наступного етапу - імплантації клітин ортотопічної ГЦК.

Для цього клітинну суспензію ГЦК було центрифуговано в 15-мл трубці впродовж 5 хвилин за кімнатної температури. Клітини були промиті у 10 мл фосфатного буферу та ресуспензійовані у DMEM середовищі. Зауважимо, що важливо досягти концентрації 10^6 клітин у 10 μ l за допомогою гелевого розчинника - у дослідженні автором використовувався Матрігель. Підготовлені клітини ГЦК помістили у прохолодне середовище (обклали льодом) для подальшої імплантації.

Щурам було проведено загальну анестезію з використанням кетаміну (100 мг/кг)/ксилазину(10 мг/кг). Для попередження гіпотермії щурі були поміщені на підігріту поверхню, де проводились подальші маніпуляції. Імплантація клітин відбувалась у субкапсулярну зону лівої долі печінки через серединний лапароскопічний доступ. Безпосередньо перед ортотопічною імплантацією у суспензію ГЦК клітин вводиться Матрігель (у співвідношенні 1:1). Отриманий розчин набирається стерильним інсуліновим шприцом (28-розмір голки) та ще раз на декілька хвилин занурюється у лід. Розчин повільно вводився у субкапсулярну зону, про успішність введення свідчила невелика бульбашка, яка утворювалась на поверхні печінки. Місце ін'єкції промивалося 0,9% розчином NaCl, після чого рана пошарово зашивалась. Модель формувалась на 23-24 тиждень, після чого рандомізовано було перевірено ріст пухлин за допомогою КТ та імуногістохімічного аналізу.

2.3. Передлікувальний етап: інструментальні методи дослідження

Наступним етапом було виконання селективної ангіографії з контрастуванням артеріального русла печінки з метою оцінки ангіографічної морфології внутрішньо печінкових пухлинних вузлів, локалізації та кількості живильних судин, наявності артеріальних

анастомозів. Автором було використано сучасний метод КТ-ангіографії, при якому після введення контрасту, здійснювалися пошарові рентгенівські знімки, з подальшою реконструкцією об'ємного зображення за допомогою комп'ютерної обробки даних. Судини в цьому випадку мають особливо чітку візуалізацію, завдяки чому інформативність при проведенні КТ-ангіографії в рази перевищує стандартну ангіографію. При цьому, за даними комп'ютерної томографії, у більшості випадків гепатоцелюлярна карцинома печінки виглядала як ділянка, яка має меншу щільність, ніж навколишня паренхіма.

2.4. Лікування гепатоцелюлярної карциноми

На другому етапі дослідження було використано 50 самців щурів лінії Буффало, масою 200-250 гр зі сформованою гепатоцелюлярною карциномою. Тварин було рандомізовано на 4 групи і застосовано наступні інтервенційні протоколи, наведені у таблиці 1. Перед проведенням безпосереднього лікування, важливим етапом було розрахувати дозу віропрепарату, яка має максимальний ефект, найбільшу терапевтичну цінність та максимальну толерантність. Для цього було проведене попереднє дослідження, у якому порівнювалась толерантність доз, наведених у таблиці 2.

В результаті вдалося встановити, що доза з мінімально протективними властивостями - $1 \cdot 10^7$ TCID₅₀, при цьому максимально толерантна доза розрахована на щура (середня маса тіла 230 гр) склала $7,59 \cdot 10^7$ TCID₅₀. Менша доза дозволила виявити наявність вірусу тільки в невеликих дискретних кишнях всередині пухлинної маси, що свідчить про те, що численні клітинні та мікроекологічні бар'єри пригнічують ефективне поширення вірусу. Тому, було обрано саме таку дозу віропрепарату для використання у дослідженні.

Таблиця 1 «Інтервенційні протоколи лікування»

Група	Схема терапії
А	0,9% фізіологічний розчин (контрольна)
В	Хіміоемболізація печінкової артерії емболами Pharma Sept EmboSept з Сорафенібом та простим вірусом герпесу людини
С	Емболізація печінкової артерії просоченими вірусом герпесу емболами Pharma Sept EmboSept емболами
Д	Лапароскопічна операція з інтратуморальним введенням хіміопрепарату (Сорафенібу)

Таблиця 2 «Розрахунок дози віротерапії»

Вірус	Доза (TCID ₅₀)
HSV-1 T-1	1*10 ⁹
HSV-1 T-1	1*10 ⁸
HSV-1 T-1	1*10 ⁷

Для групи В та С було проведено трансартеріальну емболізацію. Процедура виконувалася за стандартною методикою і включала такі етапи: загальна анестезія, катетеризація за Сельдінгером arteria femoralis dextra/sinistra, введення препарату та емболізація печінкової артерії, гемостаз.

Загальна анестезія включала у себе кетаміну гідрохлорид (2,5 мг на 100 гр) та 2% ксилазин гідрохлориду (0,5 мг на 100 гр).

Катетеризація стегнової артерії за Сельдінгером включала у себе транскутанну пункцію голкою найменшого діаметра зі встановленням інтрод'юссера. При цьому голка вводилась між пальцями лівої руки (середнім і вказівним) у напрямку артерії для фіксації стінки. Зріз голки краще тримати зверненим вниз, щоб уникнути проколу протилежної стінки артерії. Щойно голка проникла в просвіт артерії, кров під сильним тиском надходить у шприц. Після цього шприц від'єднується і використовується метод «катетер на голці». Контрастний барвник (Йогексол) вводився через катетер для визначення анатомії і розташування пухлини. Після того, як кровоносні судини були відображені належним чином, суміш концентрованої хіміотерапії та віропрепарату для групи В та чистого віропрепарату для групи С вводили через катетер і безпосередньо в кровоносні судини, які живлять пухлину. Для фокусної концентрації терапії мікросфери були введені в ті ж судини, які живлять пухлину, щоб блокувати подальший приплив крові до пухлини. Це слугувало не тільки для того, щоб доставити препарати хіміотерапії до пухлини, а й позбавити пухлину кисню і поживних речовин, для її знищення.

Даний метод базується на особливості кровопостачання пухлин печінки. Нормальна паренхіма має подвійне кровопостачання: з ворітної вени - до 70%, з печінкової артерії - 30%, у той час як кровопостачання пухлинного вузла до 95% здійснюється з гілок печінкової артерії. Така судинна архітектоніка дозволяє селективно вводити високі дози хіміопрепарату безпосередньо до пухлини, запобігаючи або значно зменшуючи вплив хіміопрепарату на здорові клітини печінки, а також, виключаючи ішемічне і токсичне ушкодження паренхіми.

Для групи D (рисунок 1) проводилось інтратуморальне введення хіміопрепарату. Лапаротомний етап операції розпочинався з загального знеболення кетаміну гідрохлорид (2,5 мг на 100 гр) та 2% ксилазин гідрохлориду (0,5 мг на 100 гр). Використовуючи скальпель №15 було зроблено невеликий вертикальний надріз шкіри паралельно серединній лінії, який продовжили до мечоподібного відростка. З використанням тримачів Едсона проведено розсічення шару м'язів, яке продовжено за допомогою хірургічних ножиць. На даному етапі було важливо не пошкодити судини та стінки органів абдомінальної порожнини з іншого боку мечоподібного відростка. Далі було встановлено ретрактор для повного відкриття абдомінальної порожнини. Краї операційного поля було обкладено двома марлевими підкладками розміром $7.5 * 7.5 \text{ см}^2$, попередньо змоченими в ізотонічному фізіологічному розчині. За допомогою двох бавовняних аплікаторів, оброблених ізотонічним фізіологічним розчином, з абдомінальної порожнини обережно на нижній край марлевої підкладки було виведено *intestinum* та *сесум* - дана маніпуляція дає змогу дістатися до печінки. В ліву долю печінки (в область розташування пухлини) проведено ін'єкцію хіміопрепарату, з подальшим перетисканням артерії, яка живить пухлину. Для цього 7-0 проліновим шовним матеріалом, заведеним під гастродуоденальну артерію накладено перманентну лігатуру у дистальному кінці над біфуркацією. Для тимчасової зупинки кровотоку у загальній печінковій артерії (під час ін'єкції хіміопрепарату) було накладено невелику кліпсу, для попередження кровотечі та системного розповсюдження препарату.

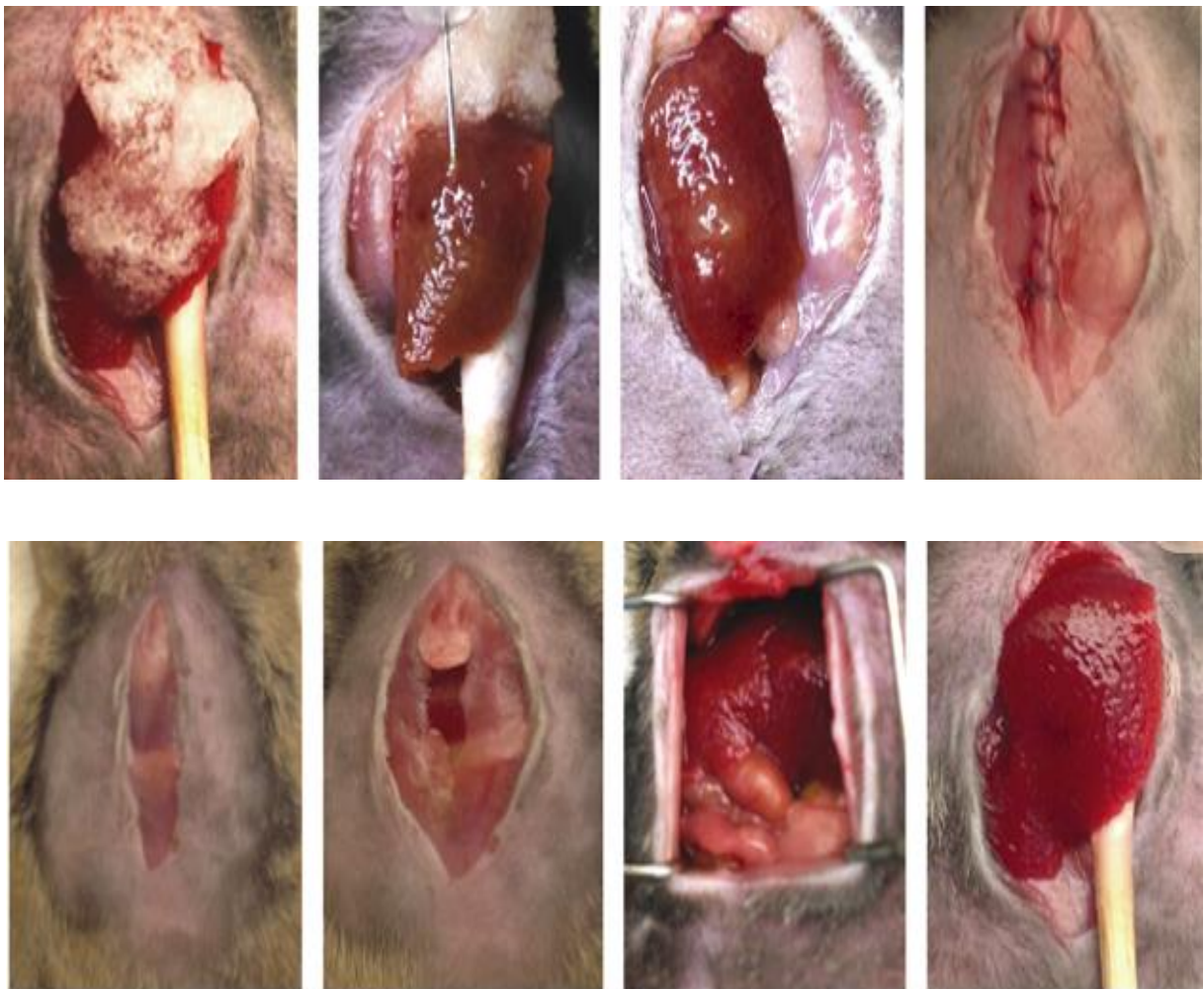


Рисунок 1

Етапи інтратуморального введення хіміопрепарату

Розрахунок хіміопрепарату Сорафеніб ХА149 (європейський протокол) було проведено за стандартною методикою. Доза препарату складала 800 мг/м^2 - площа поверхні тіла щурів складала в середньому $0,03 \text{ м}^2$. Тобто, середня доза препарату, яка вводилась одноразово складала 24 мг/м^2 .

Далі було проведено завершення оперативного втручання та виведення щурів із наркозу за допомогою Атіпамезола ($0,25 \text{ мг/100 гр}$).

Результати терапії було оцінено через 4 тижні + 2 дні.

2.5 Післяопераційний етап: макро та мікроскопічні методи дослідження

Через 4 тижні та 2 дні було проведено КТ-дослідження печінки щурів. Також було застосовано ряд мікроскопічних методик, які дали змогу оцінити результати дослідження. Для оцінки апоптозу застосовано TUNEL-метод (Terminal deoxynucleotidyl Transferase – mediated dUTP – biotin Nick- End Labeling), або термінальне дезоксиуридинове маркування кінців (рис.2) [5]. Суть TUNEL-методу полягає в специфічному зв'язуванні з 3' кінцем розірваної нитки ДНК дУТФ, міченого біотином. Методика дослідження клітинного апоптозу за допомогою методу TUNEL полягала у наступному: використовувалася детектор клітинної смерті Kits.1 × 10⁵ /мл клітин, який двічі промивали фосфатним буферним розчином (PBS). Для фіксації додавали 4% параформальдегід на 30 хвилин, отриману суспензію центрифугували на 2000 обертів/хв. протягом 10 хвилин. Надосадову рідину зливали. Клітинний осад знову промивали PBS і додавали 0,1% Тритон-Х100. Клітини охолоджували на льоду протягом 2 хв. і промивали один раз PBS . До клітинного осаду додавали 50 мкл міченої TUNEL суміші (містить термінальну дезоксиуридилтрансферазу і готова до дослідження). Усі препарати були досліджені за допомогою мікроскопа Olympus IX71 (Olympus Corporation). Результат терапії був оцінений за допомогою формул: $V = a * b^2/2$, де a (cm) найбільший діаметр пухлини; b (cm) найменший діаметр пухлини. Співвідношення росту пухлин вираховувалося за формулою: $\text{ріст пухлини} = 100 * V_{14}/V_0$, де V₀ – розмір пухлини до лікування.



Рисунок 2

Набір для оцінки апоптозу за методом TUNEL

2.6. Імуногістохімічний аналіз

Для додаткової оцінки результатів було застосовано імуногістохімічний аналіз (ІГХ). Проводились гістологічні та ІГХ дослідження трепанобіоптатів пухлин печінки з кількісним фотоцифровим морфометричним (МФМ) аналізом рівня експресії певних ІГХ маркерів та відносної площі імунопозитивних клітин.

Найчастіше в панелі маркерів для діагностики ГЦК печінки використовують антитіло HerPar-1, яке реагує з ферментом карбаміл-фосфатсинтетазою -1 мітохондрій печінки. Але в останні роки стало відомо, що HerPar-1 не є специфічним антигеном гепатоцитів печінки, він також реагує з мітохондріями епітелію каналців нирок і кишкового епітелію. На сьогодні, важливе місце у діагностуванні та контролі терапії при ГЦК визначення мітотичного поділу клітин - рівня експресії ядерного білка Ki-67 [6]. Вважається, що посилення проліферації клітин злоякісних пухлин позитивно корелює з несприятливим прогнозом.

Черезшкірні пункційні трепанобіопсії печінки були отримані голками Uni-Cut і BioCut під контролем апарату УЗД. В результаті пункції одержували 2-3 стовпчики тканини печінки, завдовжки 0,2 см, що відповідало стандарту для подальшого патоморфологічного дослідження трепанобіоптата. Для патоморфологічного дослідження стовпчики трепанобіоптатів печінки фіксували у забуференому 10% формаліні та заливали у парафін. На прецезійному ротаційному мікротомі виготовлялися серійні парафінові зрізи завтовшки 3-4 мкм фарбували гематоксиліном та еозином за Ван Гізом і Массон-триколом, а також після температурного демаскування антигенів й пригнічення активності ендогенної пероксидази, використовували для ІГХ з відповідними первинними антитілами та системою візуалізації EnVision FLEX з діамінобензидином (DAKO, США). Клітини пухлин маркували з використанням моноклональних антитіл (mAbs) проти CTLA-4, PD-L1

(programmed death-ligand 1) та PD-1, PD-2. Комплексне патоморфологічне дослідження трепанобіоптатів печінки проводилось гістологічними, гістохімічними, ІГХ і морфометричними методиками. ІГХ дослідження трепанобіоптатів печінки виконувались в парафінових зрізах з використанням моноклональних та поліклональних антитіл. Після депарафінізації і регідратації зрізів проводили високотемпературне демаскування антигенів, нагріванням на водяній бані. Оцінку результатів ІГХ-реакції проводили з використанням мікроскопу AxioPlan 2 (Carl Zeiss, Німеччина) та документували цифровою фотокамерою Camedia C5060WZ (Olympus, Японія). Рівень проліферативної активності пухлинних клітин визначали за ядерною експресією Ki-67 в балах: 0 балів = 0–5% клітин з імунопозитивними ядрами, 1 бал = 6–25% клітин, 2 бали = 26–50% позитивних клітин, 3 бали = 51–75% клітин, 4 бали = 76–100% клітин з імунопозитивними ядрами.

2.7 Статистичні методи дослідження

У дослідженні було застосовано аналітичну компарацію для дослідження кореляції та закономірностей між залежною та незалежними ознаками. Його було проведено щонайменше за двома ознаками, одна з яких відображає причину (факторна- частота утворення гепатоцелюлярної карциноми), інша – наслідок (результатна - частота позитивної відповіді на лікування). Для визначення результатів дослідження, а саме перевірки рівності дисперсій вибірок було застосовано параметричний критерій - критерій Фішера, з попередньою перевіркою нормальності.

Для оцінки **відповіді пухлини (ВП)** на лікування було використано комплекс індукованих протипухлинною терапією альтернативно-деструктивних змін у новоутворенні.

ВООЗ було ухвалено критерії оцінки відповіді солідних пухлин (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors – RECIST). Однак, для оцінки

відповіді ГЦК використовують модифіковані критерії - mRECIST (modified response evaluation criteria in solid tumors), які дають змогу оцінити. Не лише об'єктивну відповідь, а й рівень контролю пухлини.

Оцінка первинного дослідження, яка включає в себе:

- 1) Пошук вимірюваних вогнищ;
- 2) Вибір цільових і нецільових утворень;
- 3) Вимірювання цільових утворень в артеріальну фазу

контрастування.

2. Оцінка контрольного дослідження включає в себе:

- 1) Вимірювання цільових утворень;
- 2) Оцінка нецільових утворень і пошук нових вогнищ;
- 3) Розрахунок відповіді пухлини в залежності від тимчасової точки.

Згідно з класифікацією вирізняють [19]:

- повну відповідь (Complete Response – CR) – відсутність посилення в артеріальну фазу у всіх цільових утворень або повне зникнення усіх пухлинних уражень у період 4 тижнів з моменту документації повної відповіді;

- часткову відповідь (Partial Responce – PR)- зменшення суми довгих розмірів «видимих» цільових утворень (з посиленням в артеріальну фазу) зменшення. Застосовують суму вимірів 2 великих перпендикулярних діаметрів, що оцінюється в 2 спостереженнях впродовж 4 тижнів;

- прогресування захворювання (Progressive Disease – PD) – 20% збільшення суми довгих розмірів «видимих» цільових утворень (з посиленням в артеріальну фазу);

- стабілізація захворювання (Stable Disease – SD) – всі інші випадки. Дані матеріали та методи є передумовою формування якісного результату дослідження з рівнем доказовості В (правомочність рекомендації доведена в одному рандомізованому дослідженні).

РОЗДІЛ III

ХАРАКТЕРИСТИКА РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Проліферативна здатність клітин пухлини є не лише мішенню для пошуку нових лікарських засобів хіміотерапії та вдосконалення відомих методів лікування злоякісних новоутворень, але й достовірним безпосереднім морфологічним критерієм ефективності терапії, а також одним з провідних показників ступеня патоморфозу. Апоптоз - важливий елемент різних клітинних функцій, від підтримки динамічної рівноваги (гомеостазу) до імунного захисту. З точки зору сучасної клітинної терапії, особливо важливі дві функції: знищення дефектних клітин і забезпечення «санітарної чистоти» шляхом фагоцитозу. Таким чином, важливим критерієм якісної терапії потрібно вважати рівень апоптозу пухлинних клітин. Використовуючи метод TUNEL, результати виявилися наступними (рис.3):

Відносний ріст пухлини становить у:

групі А: 477,8% ± 161,6 %

групі В: 120,7% ± 83,5 %

групі С: 138,9% ± 74,4 %

групі D: 142,7% ± 83,5 %

Найбільша різниця спостерігалася в групах А та В, В та D ($P < 0,05$). Різниці між групами С та В , С та D не були статистично значимими ($P > 0,05$). Визначалась фреквенція зменшення об'єму пухлини більше, ніж на 45% у групах В, С та D.

Кількість TUNEL-позитивних пухлинних клітин на 100 пухлинних використовували для розрахунку апоптичного індексу (AI). Відносний ріст пухлини та AI були виражені як середнє значення ± стандартне відхилення (СВ), проаналізували дані за допомогою дисперсійного аналізу (один із способів аналізу дисперсії), з використанням ANOVA методу.

Апоптичний показник склав (рис.4):

група А - $1,4\% \pm 0,4\%$

група В - $8,2\% \pm 0,3\%$

група С - $7,3\% \pm 1,0\%$

група D - $5,0\% \pm 1,6\%$



Рисунок 3
Графік відображення відносного росту пухлини

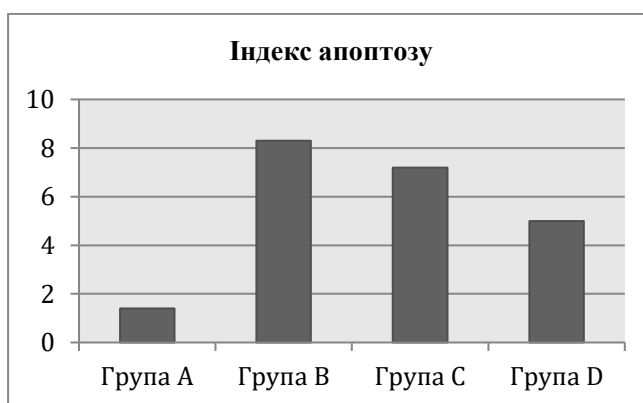


Рисунок 4
Графік, що відображає рівень апоптозу

Аналіз ANOVA дозволив встановити найбільший індекс апоптозу в групі В відносно до апоптичного показника контрольної групи ($P < 0,05$). Відмінності також спостерігаються у групі В, у співставленні з іншими двома групами ($P < 0,05$). При мікроскопії клітини гепатоцелюлярного раку поліморфні, мають щільну еозинофільну цитоплазму і відносно велике овальне базофільне ядро з щільним хроматином. Кількість клітин з фігурами мітозу та апоптотичних клітин варіює від невеликої до значної. Клітини утворюють чотирьох або багатоклітинні трабекули і скупчення, між якими розташовуються атипові синусоїди, вистелені сплосченим ендотелієм. При мікроскопії в трепанобіоптатах печінки контрольної групи спостерігається інвазивний зріст гепатоцелюлярного раку в перифокальну тканину. При імуногістохімічному аналізі було виявлено ряд особливостей онколітичної дії ВПГ. У групі А виявлено Т-

лімфоцитарну інфільтрацію, CTLA-4, PD-L1 і PD-L2, внутрішньоклітинні кінази (с-CRAF, BRAF) та кінази клітинної поверхні (KIT, FLT-3, RET, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 і PDGFR- β), що свідчить про прогресію пухлини.

У групах В,С та D виявлено велику кількість НК-клітин та макрофагів, а також експресію білкового антигену CD8+, при цьому виявлено інгібування кіназ клітинної поверхні FLT-3, RET, VEGFR-1 та PDGFR- β . Дані результати свідчили про активні онколітичні властивості герпесвірусу людини першого штаму. Однак, цікавою виявилась відмінність імуногістохімічного аналізу між групами В та С, яка полягала у тому, у групі В відбувалося інгібування як PD-L1 так і PD-L2 з вивільненням anti PD-L1 та anti PD-L2, що свідчило про повний онколіз. У групі С спостерігалось інгібування PD-L1, при цьому PD-L2 - наростав. У групі D відмічалось часткове інгібування PD-L2, але спостерігалось наростання PDGFR- β (рисунок 5).

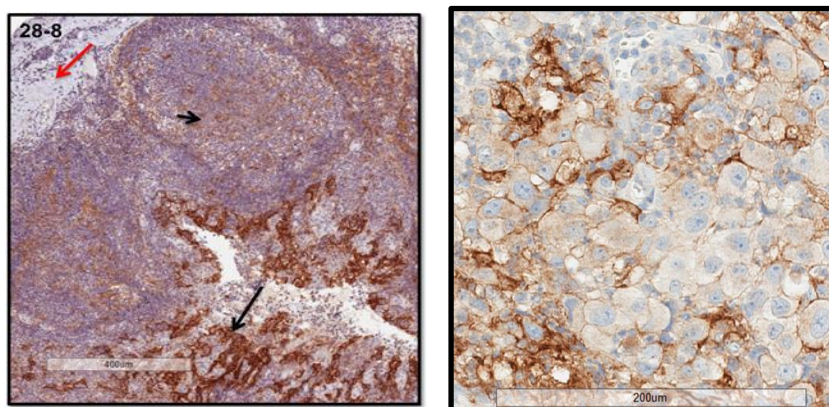


Рисунок 5

Визначення anti PD-L1 та anti PD-L2 у групі В (Імуногістохімічний аналіз Formalin/PFA-fixed paraffin-embedded sections)

Як вже зазначалося, злоякісна пухлина печінки кровопостачається гілками печінкової артерії, і візуалізація пухлини ґрунтується на виявленні ділянок зі збагаченим кровопостачанням. Тому, повноту деструкції пухлин оцінювали за даними КТ з внутрішньовенним

контрастуванням. Успішно проведена терапія пухлини проявляється на КТ як неконтрастна зона низької щільності на зображеннях в артеріальну й венозну (портальну) фази дослідження (рисунок 6). Так, у групі А частота повних некрозів пухлин склала – 0%; у групі В – 86,2%; у групі С – 83,5%; у групі D – 75,1%.

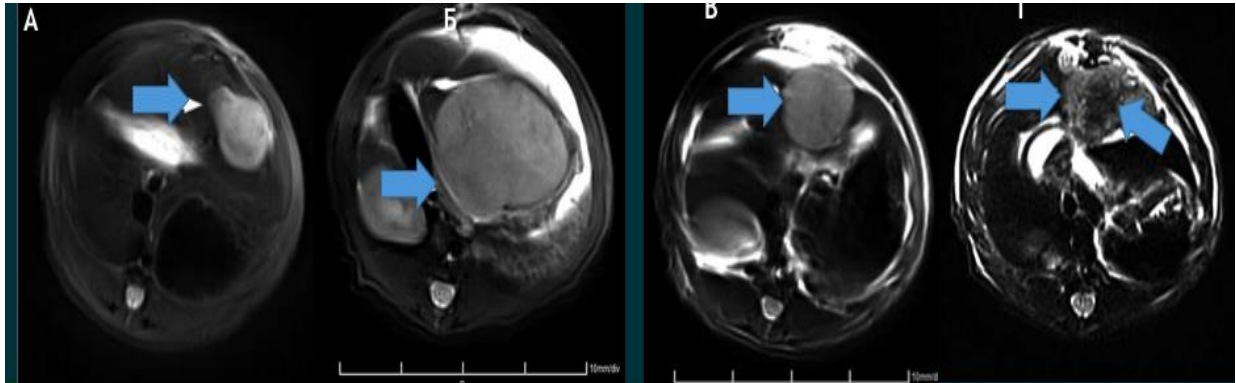


Рисунок 6. Зображення КТ перед лікуванням та після лікування у контрольній групі (А,Б) та групі В (В,Г)

РОЗДІЛ IV

АНАЛІЗ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

У дослідженні було використано 70 самців щурів лінії Буффало, з масою 200-250 гр. Після моделювання гепатоцелюлярної карциноми на тлі цирозу печінки тварин було рандомізовано на 4 групи по 8 у кожній: група А (контрольна) – введення 0,9% фізіологічного розчину; група В - трансартеріальна хіміоеMBOLІЗАЦІЯ печінкової артерії емболами Pharma Sept EmboSept з Сорафенібом та простим вірусом герпесу людини; група С– емболізація печінкової артерії просоченими вірусом герпесу емболами Pharma Sept EmboSept; група D– лапароскопічна операція з інтратуморальним введенням хіміотерапії.

Результати було оцінено з використанням комп'ютерної томографії, як візуального методу; сучасної методики TUNEL для виявлення рівня апоптозу та імуногістохімічного дослідження. Значні зміни індексу апоптозу спостерігалися в групах В, С, D у порівнянні з контрольною групою ($P < 0,05$). У 100% випадків застосування онколітичної віротерапії простим вірусом герпесу людини першого штаму (та її модифікації) було технічно успішним. Спостерігалася клінічна відповідь у вигляді зменшення пухлинних вузлів або їх стабілізації. Таким чином, дане дослідження відкриває нове поле для дискусій у пошуках дієвого лікування у цілому в онкології.

Гістологічне дослідження вказало на те, що віротерапія продукувала дифузну капілярну дилатацію з субсеквестральною мультифокальною геморагією та мобілізацією мононуклеарів пухлинних клітин в печінці. Автором було зареєстровано редукцію розмірів пухлинних вузлів після застосування як комбінованої терапії, так і монотерапії. Було знайдено лімфоцити, макрофаги, пов'язані з пухлинними клітинами у пухлинних вузлах, які розпадаються або невеликих залишкових вузлах. Секції

кріостату печінки, показали обширні крововиливи в паренхіму та внутрішню пухлинну конкрецію після фарбування гематоксилином та еозином і підтвердили спостереження на парафінових зрізах. Спостерігалось підвищення інфільтративних пухлинних макрофагів (рисунок 7).

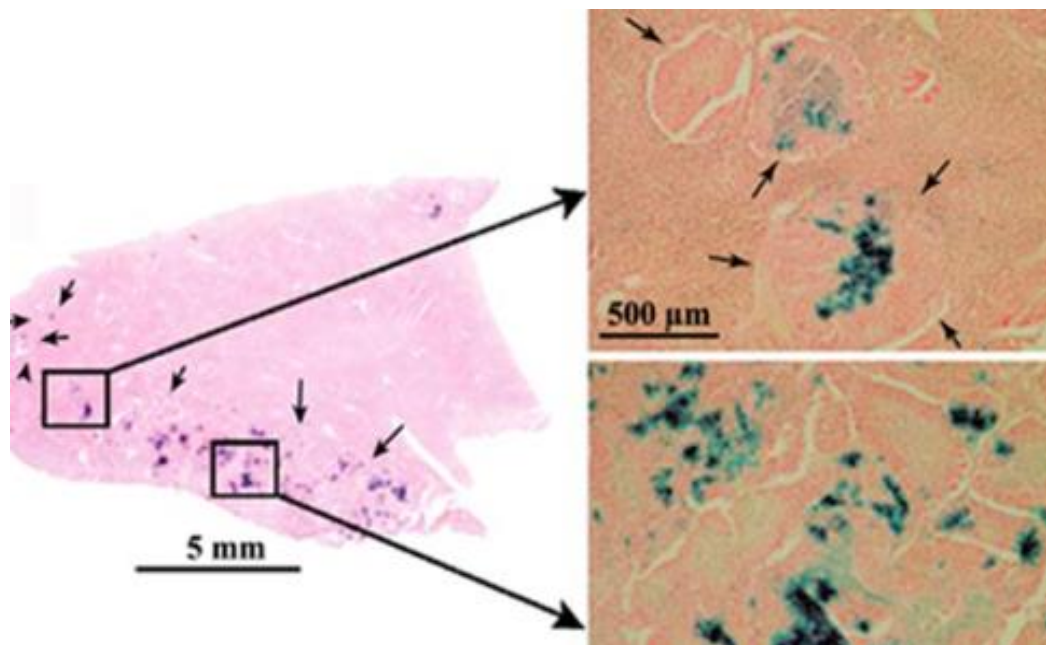


Рисунок 7

Секції печінки з зображенням зон відокремлення пухлинного процесу та здорової паренхіми печінки

Ці дані, отримані при фарбуванні MAC-i, були підтверджені фарбуванням макрофагів F4 / 80. Після інтратуморального лікування ступінь інфільтрації макрофагів змінювалася в окремих пухлинах, але не так суттєво, як внаслідок комбінованої терапії або моно – вірусної терапії. Контроль за станом печінки, обробленої фізіологічним розчином, показав лише кілька макрофагів всередині пухлинних конкрецій. У контрольній групі спостерігали лише кілька CD8 + Т-клітин. Важливо зазначити, що

найважливішим виявилось те, що у В відбувалося інгібування як PD-L1 так і PD-L2, що свідчило про повний онколіз. У групі С спостерігалось інгібування PD-L1, при цьому PD-L2 - наростав. У групі D відмічалось часткове інгібування PD-L2, але спостерігалось наростання PDGFR- β . Дані результати свідчать про часткове маскування пухлинних клітин при застосуванні лише трансартеріальної віротерапії, але при цьому відбувається повний лізис пухлини при застосуванні комбінованої віро та хіміотерапії. При цьому, значні зміни індексу апоптозу спостерігалися в усіх групах, де застосовувалась віротерапія. Однак, найбільшим ІА був у групі В, в порівнянні з іншими трьома групами ($P < 0,05$).

Критерій Фішера для регресійної моделі відображає кореляцію загальної дисперсії та залежної змінної. Отримана величина F (критерій Фішера) потрапила у зону значимості у кореляції груп А та В і склала 4,63 – $p < 0,05$, А та С - 4,45 – $p < 0,05$, А та D - 4,23 – $p < 0,05$.

За критеріями mRECIST встановлено, що відповідь пухлини на лікування була найвищою у групі В, на що вказує мінімальний показник прогресії та найвищий ступінь регресії пухлини.

ВИСНОВКИ

Моно- та комбінована віротерапія вірусом простого герпесу людини першого штаму володіє потужним протипухлинним ефектом при гепатоцелюлярній карциномі на тлі цирозу печінки.

В ході дослідження вдалося простежити та оцінити етапи лізису пухлини та частоту повних некрозів пухлини під контролем комп'ютерної томографії. Так, у групі А (контрольна) частота повних некрозів пухлин склала – 0%; у групі В (трансартеріальна хіміоемболізація печінкової артерії емболами Pharma Sept EmboSept з Сорафенібом та простим вірусом герпесу людини) – 86,2%; у групі С (емболізація печінкової артерії просоченими вірусом герпесу емболами Pharma Sept EmboSept) – 83,5%; у групі D (лапароскопічна операція з інтратуморальним введенням хіміотерапії) – 75,1%. За критеріями mRECIST встановлено, що відповідь пухлини на лікування була найвищою у групі В, на що вказує мінімальний показник прогресії та найвищий ступінь регресії пухлини.

Вдалося оцінити відносний ріст пухлин та індекс апоптозу пухлинних клітин за допомогою TUNEL методики з використанням аналізу ANOVA з повторними вимірами: виявлено, що онколітичний вірус імплантується в ракові клітини і реплікується в цитозолі. Це викликає онколіз і активацію неоантигенів, які вивільняються з лізованих ракових клітин. Дане явище активізує імунний механізм проти оточуючих ракових клітин, а зв'язані молекули хіміопрепарату та вірусу інгібують дію CTLA-4, PD-L1 і PD-L2 в клітинах печінки.

Встановлено, що герпесвірус людини зв'язується з глікопротеїнами пухлини (gC та gB) та гепариновими протеогліканами клітинної поверхні. Окрім того, медіатори вірусу герпесу проникаючи усередину пухлинних клітин активують нектин-1 або 3-О-сульфатований гепарин. Це викликає опосередковане злиття вірусної оболонки та порушення імунологічної

толерантності, що обумовлює високу ефективність протипухлинної терапії.

Отримані результати комбінованої віротерапії з транс артеріальною хіміоемболізацією свідчать про вплив не лише на тканинну та клітинні ланки онкогенезу, а й на молекулярну, що є прогностично важливим. Під час дослідження встановлено, що позитивний ефект (повна та часткова регресія) був вищим у групі, де застосовувалась комбінована методика лікування, адже остання сприяє апоптозу клітин.

За матеріалами дослідження планується створити патент на корисну модель.

АНОТАЦІЯ

Актуальність: Щорічно у всьому світі від гепатоцелюлярної карциноми (ГЦК) вмирає понад 800,000 людей [Peter Ferenci 2017]. ГЦК є високоактивною пухлиною, стійкою до традиційної хіміо та променевої терапії, що сприяє поганим прогнозам наслідків лікування та виживання. Для лікування ГЦК розроблено різні протипухлинні препарати, однак вони здатні продовжити тривалість виживання приблизно на 3 місяці [T. Noto, L.Goyal]. Онколітична віротерапія зарекомендувала себе як перспективний метод лікування злоякісних новоутворень. При цьому ефект може бути посилений шляхом комбінованої терапії.

Мета: дослідити вплив локорегіональної онколітичної віротерапії Herpes simplex virus (HSV-1 T-01) в поєднанні з емболізацією розчинними мікросферами на ортотопічну ГЦК у щурів.

Матеріали та методи: дослідження проведено на 50 самцях щурів лінії Буффало з мультифокальними ортотопічними вузлами ГЦК. група А (контрольна) – введення 0,9% фізіологічного розчину; група В - трансартеріальна хіміоемболізація печінкової артерії емболами Pharma Sept EmboSept з Сорафенібом та простим вірусом герпесу людини; група С– емболізація печінкової артерії просоченими вірусом герпесу емболами Pharma Sept EmboSept емболами; група D– лапароскопічна операція з інтратуморальним введенням хіміотерапії.

Після проведення необхідного обсягу лікування було проведено гістологічний та імуногістохімічний аналіз результатів, оцінка відповіді пухлини проведена за критеріями mRECIST.

Результати: значні зміни індексу апоптозу спостерігалися в усіх групах, де застосовувалась віротерапія. Однак, найбільшим ІА був у групі В, в порівнянні з іншими трьома групами ($P < 0,05$).

Висновки: онколітична віротерапія показала перспективні результати в лікуванні ГЦК, однак відзначається посилення ефекту шляхом комбінованої терапії. Кінцеві результати дослідження показали позитивні результати при лікуванні ГЦК. Таким чином, комбінована онколітична терапія з блокуванням імунної контрольної точки, підвищує швидкість досягнення максимального ефекту лікування і є однією з найбільш ефективних методик лікування ГЦК на сьогодні.

Наукові публікації: загальна кількість опублікованих за матеріалами роботи тез – 8. Результати дослідження представлено на міжнародних конференціях у Бельгії, Шотландії, Іспанії, Великій Британії. Робота відзначена нагородами міжнародних та українських конференцій та конгресів. Матеріали роботи прийнято до друку в міжнародний медичний журнал.

Дослідження виконано автором самотійно у рамках грантової програми допомоги молодим науковцям (копія сертифікату надається у додатку).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1.EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma

<http://www.easl.eu/medias/cpg/2018/Hepatocellular%20carcinoma/English-report.pdf>

2. Cancer Today <http://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map>

3.EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma

<http://www.easl.eu/medias/cpg/2018/Hepatocellular%20carcinoma/English-report.pdf>

4. Cancer Today <http://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map>

5.Llovet J. M., Bruix J. Systematic review of randomized trials for unresectable cancer: chemoembolization improves survival //Hepatology. – 2017. – Т. 37. – №. 2. – С. 429-442.

6.Kerrigan L. A. etal. TUNEL-positive ganglion cells in HCC //Archives of hepatology. – 2018. – Т. 115. – №. 8. – С. 1031-1035.

7.De Santis C. E. etal. Cancer treatment and survivor ship statistics, 2014 //CA: a cancer journal for clinicians. – 2014. – Т. 64. – №. 4. – С. 252-271.

8.Каледа в. И. Свенивар сельдингер (1921-1998 гг.) И его метод катетеризации артерий //диагностическая и интервенционная радиология. – 2016. – т. 10. – №. 1. – с. 64-67.

9.Parkin D. M. etal. Global cancer statistics, 2002 //CA: a cancer journal for clinicians. – 2005. – Т. 55. – №. 2. – С. 74-108.

10.Rimkunas V. M. etal. Analysis of receptor tyrosinekinase ROS1-positive tumor sinnon–small cell lung cancer: identification of a FIG-ROS1

11. Bruix J., Sherman M., D. American Association for the Study of Liver Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology*. 2011;53(3):1020–1022. doi: 10.1002/hep.24199.
12. Ferlay J., Soerjomataram I., Dikshit R., et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*. 2015;136(5):E359–E386. doi: 10.1002/ijc.29210.
13. Farazi P. A., DePinho R. A. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nature Reviews. Cancer*. 2006;6(9):674–687. doi: 10.1038/nrc1934.
14. Perz J., Armstrong G., Farrington L., Hutin Y. J. F., Bell B. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *Journal of Hepatology*. 2006;45(4):529–538. doi: 10.1016/j.jhep.2006.05.013.
15. Arzumanyan A., Reis H. M. G. P. V., Feitelson M. Pathogenic mechanisms in HBV- and HCV-associated hepatocellular carcinoma. *Nature Reviews. Cancer*. 2013;13(2):123–135. doi: 10.1038/nrc3449.
16. European Association For The Study Of The Liver. EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*. 2012;56(4):908–943. doi: 10.1016/j.jhep.2011.12.001.
17. El-Serag HB, Marrero JA, Rudolph L, Reddy KR. Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2008;134:1752–63.

ДОДАТОК 1

СХЕМИ, ТАБЛИЦІ ТА ІЛЮСТРАЦІЇ

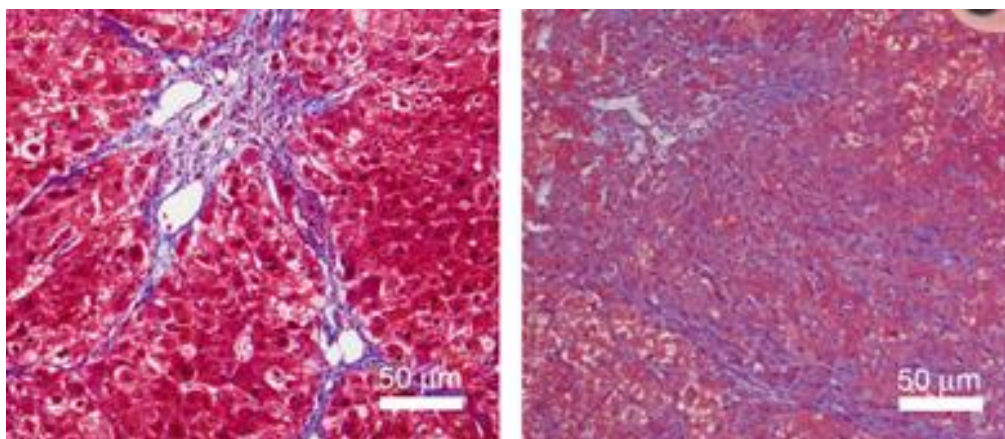


Рисунок 1. Трихромне фарбування тканини печінки за Массоном



Рисунок 2. Фото авторки під час виконання розрахунку віропрепарату

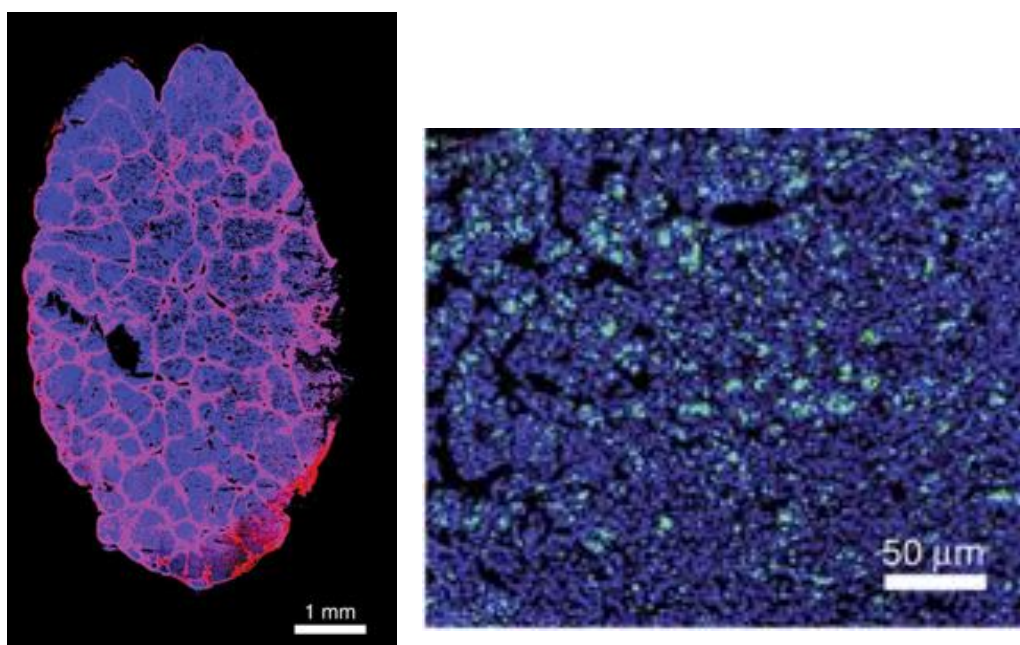


Рисунок 3. Імунофлюоресцентне фарбування циротичних змін печінки у щурів після 12 тижнів CCl₄