

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ**  
**НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**  
**ІМЕНІ О.О. БОГОМОЛЬЦЯ**

Кваліфікаційна наукова праця  
на правах рукопису

**ЧИТАЄВА ГАЛИНА ЄВГЕНІВНА**

УДК: 616.24-006.4-008.9-092.18-076:616-007.7-097-079.7

**ДИСЕРТАЦІЯ**

**МОРФОЛОГІЧНІ ТА ІМУНОГІСТОХІМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ**  
**НЕЙРОЕНДОКРИННИХ НОВОУТВОРЕНЬ ЛЕГЕНЬ**

22 «Охорона здоров'я»  
222 «Медицина»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

————— Читаєва Г.Є.

Науковий керівник — Захарцева Любов Михайлівна, доктор медичних наук,  
професор

Київ – 2023

## АНОТАЦІЯ

*Читаєва Г.Є.* Морфологічні та імуногістохімічні особливості нейроендокринних новоутворень легень. Кваліфікаційна робота на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії (PhD) з галузі знань 22 «Охорона здоров'я» за спеціальністю 222 «Медицина». — Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, МОЗ України, Київ, 2023.

Нейроендокринні новоутворення (НЕН) — гетерогенна група рідкісних пухлин, які походять з клітин дифузної нейроендокринної системи різних органів і різняться за номенклатурою, морфологічними, імуногістохімічними (ІГХ), генетичними характеристиками, клінічним перебігом і прогнозом. За даними літератури, захворюваність на НЕН у різних країнах світу коливається від 2 до 8 випадків на 100 тис. населення (до 2% в структурі онкологічних захворювань). Впродовж останніх 30 років частота виявлення НЕН збільшилися майже у 6,4 разу, переважно завдяки удосконаленню методів дослідження та діагностичних алгоритмів. Найчастіше НЕН виявляють у шлунково-кишковому тракті та легенях.

Для НЕН легень характерні неспецифічні, «стерті» клінічні прояви; незважаючи на досягнення сучасної медицини, їх виявляють переважно на пізніх стадіях: у понад 50% пацієнтів на момент встановлення діагнозу наявні регіонарні, у майже 30% — віддалені метастази. Це суттєво погіршує прогноз, зокрема, за наявності відділених метастазів на момент встановлення діагнозу НЕН легень виживаність хворих як правило не перевищує 8–11 міс.

Класифікація НЕН легень за останні 20 років зазнала кількох суттєвих змін і переглядів. На сьогоднішній день серед вчених і клініцистів бракує узгодженості у відношенні термінології, що не дозволяє однозначно

тракувати результати і без того нечисленних досліджень. Дотепер точаться дискусії щодо критеріїв градації НЕН бронхолегеневої локалізації за ступенем диференціювання, що має неабияке практичне значення. Питання коректної та своєчасної діагностики цієї патології, визначення додаткових надійних діагностичних і прогностичних чинників не втрачає своєї актуальності.

За даними статистики, у 2020 р. за частотою виявлення рак легень посідав III місце в світі серед усіх випадків онкологічних захворювань (22,4 на 100 тис. населення), проте, смертність вийшла у рейтингу на I місце (18,0 на 100 тис. населення), значно перевищивши таку при злякисних новоутвореннях інших локацій. За даними різних джерел, на бронхолегеневі НЕН припадає близько 25–27% в структурі всіх нейроендокринних новоутворень і від 2 до 20% в структурі первинних пухлин легень [42, 43, 84].

Діагноз НЕН легень встановлюють з урахуванням органоїдної морфології, мітотичного індексу, вогнищ некрозу, індексу проліферації Ki-67, експресії нейроендокринних маркерів. За сучасною класифікацією НЕН бронхолегеневої локалізації розподілені на 4 гістологічних підтипи: до новоутворень низького і проміжного ступенів злякисності віднесені типовий (ТС) і атиповий (АС) карциноїди; але переважну більшість складають LCNEC (крупноклітинні нейроендокринні карциноми) і SCLC (дрібноклітинні нейроендокринні карциноми легень) — низько диференційовані агресивні пухлини з невтішним прогнозом. Більшість сучасних досліджень присвячені оптимізації діагностики, визначенню та уточненню прогностичних факторів при НЕН легень [70, 85, 97, 232, 240]. У публікаціях зазвичай фігурують LCNEC і SCLC, які складають найбільш численну групу НЕН (майже 75% всіх випадків) і до 18–23% серед первинних пухлин легень. ТС і АС — більш рідкісні новоутворення, однак, їх агресивність часто недооцінюють: незважаючи на досить низький рівень проліферативної активності, на момент встановлення діагнозу не виключена наявність метастазів, у тому числі

віддалених, що зазвичай асоціюється з поганим прогнозом і критичним зменшенням тривалості життя пацієнтів [99, 106, 151, 246].

ІГХ-дослідження вважається «золотим стандартом» патоморфологічної діагностики і має критичне значення для верифікації діагнозу при підозрі на наявність нейроендокринної пухлини, однак, існує тенденція до зниження або й втрати експресії певних ІГХ-маркерів (в першу чергу, нейроендокринних) у низько диференційованих новоутвореннях, що ускладнює діагностику [50, 73, 75, 107, 114, 164, 218, 241].

ІГХ посідає чільне місце в діагностиці НЕН бронхолегеневої локалізації, забезпечуючи її точність, проте, інтерпретація результатів дослідження у деяких ситуаціях залишається складною через неузгодженість морфологічних та ІГХ-критеріїв. Актуальним є вивчення кореляції між експресією біомаркерів і ключовими морфологічними характеристиками у НЕН легень, а також визначення статистично достовірних діагностичних і прогностичних показників.

Дане дослідження покликане визначити додаткові морфологічні та імуногістохімічні фактори для діагностики та прогнозу клінічного перебігу нейроендокринних новоутворень легень.

Вирішення зазначеної проблеми та обґрунтування отриманих результатів досягнуте завдяки застосуванню комплексу сучасних методів дослідження НЕН бронхолегеневої локалізації: гістологічних, імуногістохімічних і статистичної обробки даних.

За даними медичної документації, у Київському міському онкологічному центрі (2010–2020 рр.) з 1237 462 (37,35%) НЕН мали бронхолегеневу локалізацію (II місце за частотою після НЕН шлунково-кишкового тракту).

З метою більш детального визначення частоти виявлення зазначеної патології, вікового розподілу, морфологічних особливостей, показників

виживаності проведений ретроспективно-проспективний аналіз медичної документації, гістологічних препаратів (операційний і біопсійний матеріал), вивчено експресію ІГХ-маркерів у 113 спостереженнях НЕН бронхолегеневої локалізації (хворі, яких лікували у Київському міському онкологічному центрі у період з 2010 по 2020 р.). Структура вибірки була наступною: ТС — 9 (7,96%) випадків, АС — 40 (35,40%), LCNEC — 20 (17,70%), SCLC — 44 (38,94%). Зазвичай НЕН бронхолегеневої локалізації діагностували у пацієнтів віком 59,5 років, 95% ДІ (53,8–64,3).

Експресія ІГХ-маркерів є досить варіабельною у різних гістологічних підтипах НЕН бронхолегеневої локалізації, часто дані є описовими, їх кореляція з морфологічними ознаками вивчена недостатньо. За результатами гістологічного та ІГХ-дослідження (113 зразків) вивчено наявність статистично значущої кореляції між експресією різних біомаркерів (ChrA, Syn, CD56, TTF-1, CK7 та Ki-67), некрозом, і ступенем диференціювання НЕН легень (рангова кореляція Спірмена). Виявлений сильний кореляційний зв'язок ( $p < 0,05$ ) між експресією ChrA та ІГХ-маркерів первинних пухлин легень (TTF-1 і CK7), які переважно відзначають у високо та помірно диференційованих НЕН легень. Визначений сильний негативний кореляційний зв'язок ( $p < 0,05$ ) між реакцією на ChrA та наявністю і вираженістю вогнищ некрозу; між експресією ChrA і проліферацією пухлинних клітин (рівень Ki-67) ( $p < 0,01$ ); а також між ChrA та ступенем диференціювання пухлини ( $p < 0,01$ ). Решта перевірених комбінацій показників, для інших маркерів не були статистично значущими. Визначено, що зниження або втрата експресії ChrA є надійним свідченням пухлинної прогресії. Експресія ChrA може бути використана як додатковий інструмент для розподілу нейроендокринних новоутворень легень за ступенем злоякісності.

Мітотичний індекс (МІ) і Ki-67 — основні критерії оцінки проліферативної активності клітин злоякісних новоутворень і базові стандарти

для грейдінгу НЕН легень, проте, кожен з цих показників має певні обмеження. Фосфогістон-3 (РННЗ) — відносно новий ІГХ-маркер, який використовують для об'єктивізації оцінки мітотичної активності у різних пухлинах. Він дозволяє виявити мітози, які легко пропустити при звичайному підрахунку, до того ж його вважають більш надійним і відтворюваним, ніж Кі-67. За результатами гістологічного та ІГХ-дослідження операційного та біопсійного матеріалу (n=64) оцінений зв'язок мітотичного індексу, некрозу, ІГХ-маркерів проліферації Кі-67, РННЗ та їх цінність як предикторів агресивності НЕН легень. Показники мітотичного індексу, Кі-67, РННЗ оцінювали за допомогою методів непараметричної статистики (критерій Манна-Уїтні, критерій кореляції Спірмена); 95% ДІ підрахований за допомогою адаптованого методу Вальда; для оцінки виживаності використані критерій Каплан-Мейєра та Логранк тест. Виявлений статистично вірогідний зв'язок між вираженістю некрозу та виживаністю пацієнтів ( $p=0,021$ ) — це стосувалося порівняння груп хворих без вогнищ некрозу у тканині пухлини та з екстенсивними вогнищами некрозу ( $p=0,023$ ). МІ достовірно пов'язаний з наявністю метастазів у лімфатичних вузлах ( $p=0,003$ ) і віддалених метастазів ( $p=0,029$ ). Відзначений значущий прямий зв'язок між МІ та рівнем Кі-67 і ( $p<0,001$ ), МІ та експресією РННЗ ( $p<0,001$ ). Не виявлено значущого зв'язку між рівнями Кі-67 і РННЗ ( $p=0,240$ ), як і між Кі-67, наявністю вогнищ некрозу та метастазів, виживаністю пацієнтів. Мітотичний індекс і некроз є надійними маркерами для оцінки агресивності НЕН легень. МІ статистично вірогідно пов'язаний з наявністю метастатичного ураження, а екстенсивний некроз — з показниками виживаності. Кі-67 вірогідно пов'язаний з МІ. Не виявлений вірогідний зв'язок між експресією Кі-67 і РННЗ, а також рівнем Кі-67 і морфологічними особливостями пухлини, прогресією захворювання та прогнозом. Експресія РННЗ та результати її оцінювання виявилися доволі неоднозначними: рівень експресії РННЗ був нижчим за очікуваний і не перевищував такий для Кі-67 і МІ. Всупереч нашим припущенням, РННЗ при НЕН легень не є діагностичним або прогностичним чинником.

За результатами ІГХ-дослідження (113 випадків) здійснене попарне порівняння груп пацієнтів при наявності регіонарних і віддалених метастазів та їх відсутності за рівнем експресії Ki-67 (за допомогою критерію Крускала-Уолліса з використанням поправки Холма-Бонферроні). ROC-крива використана для визначення «критичного» порогового значення Ki-67, за якого у пацієнтів на момент встановлення діагнозу НЕН легень був високий ризик метастатичного ураження лімфатичних вузлів. ROC-крива, хороша якість діагностичної моделі (AUC=0,75; 95% ДІ 0,603–0,891). Ймовірність виявлення метастатичного ураження лімфатичних вузлів середостіння, надключичних, голови та шиї суттєво різнилась при Ki-67  $\leq 18\%$  і  $>18\%$ , positive predictive value 91%, 95% ДІ 0,815–0,966 (чутливість методу 70%, специфічність 82,4%). Ki-67  $\geq 18\%$  і вище свідчить про високу ймовірність поширеного ураження лімфатичних вузлів на момент встановлення діагнозу НЕН легень, що є індикатором поганого прогнозу; в цьому контексті особливої уваги клініцистів потребують помірно диференційовані АС.

За результатами гістологічного та ІГХ-дослідження операційного та біопсійного матеріалу (50 випадків) оцінено прогностичну цінність додаткового маркера проліферації TOP2A. Більш високий показник Ki-67 відповідав більш високому рівню експресії TOP2A (коефіцієнт кореляції Спірмена,  $\rho=0,603$ ,  $p=0.00000362$ ). Але, на відміну від Ki-67, виявлений достовірний зв'язок між рівнем TOP2A і кількома ключовими особливостями НЕН легень. Підвищення рівня експресії TOP2A мало прогностичне значення для регіонарного метастазування та виживаності пацієнтів (ROC-крива, хороша якість діагностичної моделі, AUC=0,73; 95% ДІ 0,558–0,901). Загальна виживаність хворих (міс.) суттєво різнилась при TOP2A  $\leq 13\%$  і  $>13\%$  (Логранк тест,  $p=0,006$ ). При TOP2A  $\leq 13\%$  метастази у лімфатичні вузли на момент встановлення діагнозу зазвичай були відсутні; тривалість життя пацієнтів становила у середньому 45 міс., 1-річна виживаність сягала 100%. Натомість рівень експресії TOP2A  $>13\%$  був предиктором метастатичного ураження лімфатичних вузлів на момент встановлення діагнозу і достовірно гіршого

прогнозу: у таких випадках загальна виживаність не перевищувала 8 міс., 1-річна — виживаність 39% відповідно. Рівень експресії TOP2A більш надійний показник, ніж Ki-67, і може бути використаний в якості додаткового предиктора наявності регіонарних метастазів на момент встановлення діагнозу та скорочення тривалості життя пацієнтів при НЕН легень.

Високий рівень проліферативної активності асоційований з більшою агресивністю злоякісного новоутворення, однак здатність клітин пухлини до уникнення імунного контролю також відіграє важливу роль. Експресія PD-L1 вважається перспективною мішенню для імунотерапії, однак, вона також може мати прогностичне значення. За результатами оцінки експресії маркеру PD-L1 на матеріалі 40 біопсій при метастатичних НЕН легень (13 (32,5%) спостережень Grade 2 і 27 (67,5%) Grade 3): 72,5% зразків виявилися PD-L1-позитивними, при цьому у 69,97% випадках реакція була слабкою, локальною. Помірно диференційовані АС виявилися досить агресивними, 69,23% з них були PD-L1-позитивними. Кореляція між рівнями експресії Ki-67 і PD-L1 статистично незначуща (коефіцієнт кореляції Кендала  $\tau_b=0,042$ ,  $p>0,729$ ); також не виявлено суттєвих відмінностей рівнів експресії PD-L1 з урахуванням вираженості некрозу, фіброзу, неоангіогенезу та лімфоцитарної інфільтрації тканини пухлини. Однак тривалість життя хворих була тісно пов'язана з рівнем експресії PD-L1 у НЕН легень Grade 3. Чим вищим був рівень експресії PD-L1, тим меншою тривалість життя пацієнтів. У PD-L1-негативних випадках медіана виживаності хворих становила 85 міс., за низького рівня експресії PD-L1 (1–5%) вона різко скорочувалася — до 8 міс., а за помірного рівня експресії PD-L1 (6–20%) зазнавала це більш критичного зменшення — до 0,8 міс. Ймовірність більш раннього настання смерті суттєво зростала (71%) навіть за низького рівня експресії PD-L1 (1–5%) і перевищувала 80% за помірного рівня експресії PD-L1 (6–20%). Рівень експресії PD-L1 можна вважати додатковим негативним прогностичним чинником при НЕН легень Grade 3.



Вперше проведена комплексна оцінка морфологічної структури, експресії стандартних ІГХ-маркерів з метою уточнення діагнозу НЕН легень. Вперше вивчена прогностична цінність TOP2A та ChrA.

Підтверджено, що мітотичний індекс та індекс проліферації Ki-67 є основними критеріями для визначення ступеня злоякісності (грейдингу) НЕН легень. Однак сумісні рівні експресії Ki-67 і TOP2A дають більшу інформацію для оцінки злоякісності процесу та можуть бути використані в якості додаткового предиктора метастатичного ураження лімфатичних вузлів на момент встановлення діагнозу.

Визначено, що зниження або втрата експресії ChrA є надійним свідченням пухлинної прогресії. Експресія ChrA може бути використана як додатковий інструмент для розподілу НЕН легень за ступенем злоякісності.

Підвищення рівня TOP2A і PD-L1 є додатковим предиктором скорочення тривалості життя пацієнтів при НЕН легень.

Поглиблена комплексна оцінка морфології та ІГХ-профілю НЕН легень має неабияке значення для розуміння їх біологічних характеристик та прогнозу. Отримані результати дозволяють краще розуміти природу НЕН, узгодити деякі її суперечливі моменти, підвищити якість діагностики та запропонувати рекомендації для прогнозування перебігу даної патології.

Вивчені, науково обґрунтовані для практичного застосування додаткові ІГХ-маркери, що дозволяють вдосконалити морфологічну діагностику нейроендокринних новоутворень легень.

Підвищені рівні експресії Ki-67, TOP2A, PD-L1 у атипівих карциноїдах бронхолегеневої локалізації свідчать про агресивність таких новоутворень, що має зумовити високу настороженість клініцистів.

Визначені порогові значення експресії Ki-67, TOP2A, PD-L1, що дозволяє підвищити верифікацію помірно та низько диференційованих НЕН легень та прогнозувати клінічний перебіг захворювання.

Проведене дослідження сприятиме кращій обізнаності лікарів щодо НЕН легень, особливостей їх біологічної поведінки; впровадження отриманих результатів у практику дозволить оптимізувати діагностичний процес і з високою долею ймовірності визначити прогнозовану виживаність хворих.

**Ключові слова:** нейроендокринні новоутворення легень, комплексна морфологічна діагностика, гістологічні характеристики, імуногістохімічне дослідження, прогностичне значення.

## ABSTRACT

*Chytaieva H.Ye.* Morphological and immunohistochemical features of lung neuroendocrine neoplasms. Qualifying scientific work as a manuscript.

The thesis for the degree of Philosophy Doctor (PhD) of Medical Sciences, field of knowledge 22 “Health care”, specialty 222 “Medicine”. — National Medical Bogomotel's University, Ministry of Health of Ukraine, 2023.

Neuroendocrine neoplasms (NEN) — is a group of heterogenous rare tumors which originate from the diffuse neuroendocrine system cells in different organs, and differ in nomenclature, morphology, immunohistochemistry (IHC), genetic characteristics, clinical course, and prognosis. According to the literature, NEN incidence in different countries ranges from 2 to 8 cases per 100.000 population (up to 2% in the oncopathology structure). Over the past 30 years, the frequency of NEN detection has increased almost 6.4 times, mainly due to the improvement of research methods and diagnostic algorithms. Most often, NENs are found in the gastrointestinal tract and lungs.

Lung NENs are characterized by nonspecific, blurred clinical signs; despite the modern medicine achievements, they are detected mainly at late stages: more than 50% patients have regional metastases at the time of diagnosis, almost 30% - distant metastases. The prognosis getting worth significantly, in case of isolated metastases at the time of lung NEN diagnosis, survival does not exceed 8–11 months.

Lung NEN's classification has undergone several significant changes and revisions over the past 20 years. Now, there is a lack of agreement between scientists and clinicians in terminology, which enables unambiguous interpretation the results of few studies. There are still discussions about the lung NENs grading criteria according to the Grade, which is of important practical value. Correct and timely diagnosing, and additional dependable diagnostic and prognostic factors determination remain relevant.

According to statistics (2020), lung cancer ranks third among all cancer types (22.4 cases per 100.000 population) but took 1st place in mortality (18.0 per 100.000 population), significantly expanding other malignancies. According to various data, bronchopulmonary NENs account for about 25–27% of all neuroendocrine neoplasms and from 2 to 20% of primary lung tumors [42, 43, 84].

The diagnosis of lung NEN is established considering organoid morphology, mitotic index, necrotic foci, proliferation index (Ki-67), and neuroendocrine markers expression. According to the modern classification, bronchopulmonary NENs are divided into 4 histological subtypes: typical (TC) and atypical (AC) carcinoids are considered of low and intermediate degrees of malignancy; but the vast majority are LCNEC (large cell neuroendocrine carcinoma) and SCLC (small cell neuroendocrine carcinoma) — poorly differentiated, aggressive tumors with unfavourable prognosis. Most modern studies are devoted to the optimization of diagnostics, definition, and clarification of prognostic factors in lung NENs [70, 85, 97, 232, 240]. Publications usually include LCNEC and SCLC, which constitute the most numerous groups of NENs (about 75% of all cases) and up to 18–23% among primary lung tumors. TC and AC are quite rare neoplasms, but their aggressiveness is often underestimated: despite a rather low level of proliferative activity, metastases, including distant ones, are not excluded at the time of diagnosis, which is usually associated with an unfavourable prognosis and a critical decrease in patient survival [99, 106, 151, 246]. IHC is a “gold standard” of pathomorphological diagnosis and is of critical importance for the diagnosis verification if NEN is suspected, however, there is a tendency to decrease and loss of some IHC markers (primarily neuroendocrine) in poorly differentiated tumors, which complicates the diagnosis [50, 73, 75, 107, 114, 164, 218, 241].

IHC takes a prominent place in lung NENs' diagnosis, ensuring its accuracy, however, the interpretation of results is difficult sometimes due to the inconsistency of morphological and IHC criteria. It is relevant to study the correlation of biomarkers' expression and key morphological characteristics in lung NENs, as well as to determine statistically reliable diagnostic and prognostic indicators.

This study aims to determine additional morphological and immunohistochemical factors for the diagnosis and clinical prognosis of lung NENs.

The solution to this problem and the substantiation of the results obtained were achieved thanks to a set of modern methods for pulmonary NENs studying: histological, IHC, and statistical.

According to medical records (2010-2020), 1237 cases of NENs were diagnosed in the Kyiv City Oncological Center, 462 (37.35%) of them were lung NENs (the second most common location after NENs of the gastrointestinal tract).

For a more detailed estimation of the disease frequency, age distribution, morphological features, and survival rates, a retrospective-prospective study was performed: analysis of medical records, histological examination of resections, and biopsies, expression of IHC markers in 113 cases (patients at lung NENs, treated in the Kyiv City Oncological Center in a period 2010–2020). The structure of the sample was as follows: TC — 9 (7.96%) cases, AC — 40 (35.40%), LCNEC — 20 (17.70%), and SCLC — 44 (38.94%). In most cases, bronchopulmonary NENs were diagnosed in patients aged 59.5 years, 95% CI (53.8–64.3).

The IHC markers expression is variable enough in different histological subtypes of lung NENs, the data are often descriptive, and their correlation with morphological features has not been studied significantly. According to the histological and IHC examination results (113 samples), a significant correlation of different biomarkers expression (ChrA, Syn, CD56, TTF-1, CK7, and Ki-67), necrosis, and grade of lung NENs was revealed (Spearman's rank correlation). A strong correlation ( $p < 0.05$ ) was found between the expression of ChrA and IHC markers of primary lung tumors (TTF-1 and CK7), which are mainly seen in highly and moderately differentiated lung NENs. A strong negative correlation between ChrA and the presence and severity of necrosis ( $p < 0.05$ ), ChrA and proliferation of tumor cells (Ki-67) ( $p < 0.01$ ) was determined; as well as ChrA and tumor grade ( $p < 0.01$ ). The rest of the tested combinations for other markers were not statistically significant. It was determined that the decrease or loss of ChrA expression is a

reliable indicator of tumor progression. ChrA expression can be used as an additional tool for the classification of lung NENs by the degree of malignancy.

The mitotic index (MI) and Ki-67 are the main criteria for the evaluation of the proliferative activity of cells in malignancies and the basic standards for lung NENs' grading, however, each of these indicators has certain limitations. Phosphohistone-3 (PHH3) is a relatively new IHC marker used to objectively assess mitotic activity in various tumors. It allows detection of mitoses that are easily missed by conventional counting and is considered more reliable and reproducible than Ki-67. According to the results of histological and IHC examination of surgical and biopsy material (n=64), the correlation between mitotic index, necrosis, IHC proliferative markers (Ki-67, PHH3), and their value as predictors of lung NENs aggressiveness was estimated. Indicators of mitotic index, Ki-67, PHH3 were evaluated using non-parametric statistical methods (Mann-Whitney test, Spearman correlation test); 95% CI was calculated using the adapted Wald method; the Kaplan-Meier test and the log-rank test were used to assess survival. A statistically significant relationship between the severity of necrosis and patient survival was found ( $p=0.021$ ) — this was related to the comparison of groups of patients without foci of necrosis in the tumor tissue and with extensive foci of necrosis ( $p=0.023$ ). MI was significantly associated with lymph node metastases ( $p=0.003$ ) and distant metastases ( $p=0.029$ ). A significant direct association was noted between MI and Ki-67 ( $p<0.001$ ), and MI and PHH3 expression ( $p<0.001$ ). There was no significant association of Ki-67 and PHH3 ( $p=0.240$ ), as well as Ki-67, necrotic foci, metastases, and patients' survival. Mitotic index and necrosis are reliable markers for assessment of lung NENs aggressiveness. MI was significantly associated with metastatic lesions, while extensive necrosis was associated with survival rates. Ki-67 is significantly associated with MI. No significant association was found between Ki-67 and PHH3 expression, as well as Ki-67 and tumor morphological features, disease progression, and prognosis. The expression of PHH3 and its evaluation were quite ambiguous: PHH3 expression was lower than expected and

did not exceed the expression of Ki-67 and MI. Contrary to our hypothesis, PHH3 in lung NEN cannot be considered a diagnostic or prognostic factor.

According to the results of IHC (113 cases), a pairwise comparison of groups of patients with and without regional and distant metastases was made considering the Ki-67 level (Kruskal-Wallis test with Holm-Bonferroni correction). The ROC-curve was used to determine the “critical” Ki-67 threshold value at which patients were at high risk of lymph node metastasis at the time of lung NEN diagnosis. The ROC curve corresponded to a good diagnostic model quality (AUC=0.75; 95% CI 0.603–0.891). The probability to detect metastases in mediastinal, supraclavicular, head and neck lymph. nodes varied significantly with Ki-67  $\leq 18\%$  and  $>18\%$ , positive predictive value 91%, 95% CI 0.815–0.966 (sensitive method efficiency 70%, specificity 82.4%). Ki-67 18% or higher shows a high probability of regional metastases at lung NENs diagnosis, which is an indicator of a poor prognosis; in this context, atypical carcinoids require special attention from clinicians.

The prognostic value of the additional proliferative marker TOP2A was estimated in 50 cases (histological and IHC examination). A higher Ki-67 index corresponded to a higher TOP2A (Spearman correlation coefficient,  $\rho=0.603$ ,  $p=0.00000362$ ).

But, unlike Ki-67, a reliable association of TOP2A and several key features of lung NENs was found. Increased TOP2A expression had prognostic value for regional metastasis and survival (ROC-curve, good quality of the diagnostic model, AUC=0.73; 95% CI 0.558–0.901). Overall survival (months) differed significantly with TOP2A  $\leq 13\%$  and  $>13\%$  (log-rank test,  $p=0.006$ ). In most cases there were no regional metastases with TOP2A  $\leq 13\%$ ; the average life expectancy was 45 months, and the 1-year survival rate reached 100%. Instead, TOP2A  $>13\%$  was a predictor of metastatic lymph node involvement at the time of diagnosis and a significantly worse prognosis: in such cases, overall survival did not exceed 8 months, and 1-year survival was 39%, respectively. The TOP2A rate is a more reliable indicator than

Ki-67 and can be used as an additional predictor of regional metastases, and shortened life expectancy at pulmonary NENs.

A high-level of proliferative activity is associated with malignancy with greater aggressiveness, but the ability of tumor cells to avoid immune control also plays an important role. PD-L1 expression is considered a promising target for immunotherapy, however, it may also have prognostic value. According to PD-L1 expression assessment (40 biopsies of metastatic lung NENs (13 (32.5%) Grade 2 and 27 (67.5%) Grade 3)): 72.5% samples were PD-L1-positive, in 69.97% cases the reaction was weak and focal. Moderately differentiated ACs were quite aggressive, 69.23% of them appeared to be PD-L1-positive. The association of Ki-67 and PD-L1 was statistically insignificant (Kendall's correlation coefficient  $\tau_b=0.042$ ,  $p>0.729$ ); also, no notable differences were seen in PD-L1 expression depending on the severity of necrosis, fibrosis, neoangiogenesis, lymphocytic infiltration. However, the life expectancy was closely related to the level of PD-L1 expression in lung NENs Grade 3. The higher the PD-L1 expression, the shorter the overall survival. In PD-L1-negative cases, the median survival was 85 months, it was sharply reduced to 8 months at low PD-L1 rates (1–5%) and experienced a more critical decrease — to 0.8 months at a moderate PD-L1 level (6–20%). The probability of earlier death significantly increased (71%) even with low PD-L1 rates (1–5%) and exceeded 80% with moderate PD-L1 level (6–20%). PD-L1 expression can be considered an additional negative prognostic factor in lung NENs Grade 3.

A comprehensive assessment of the morphological structure and standard IHC markers expression was carried out to clarify the diagnosis of lung NENs. The prognostic value of TOP2A and ChrA was studied for the first time.

It was confirmed that the mitotic index and the Ki-67 proliferation index are the main criteria for lung NENs grading. However, the combined expression of Ki-67 and TOP2A provides more information to assess the malignant process and can be used as an additional predictor of metastatic involvement of the lymph nodes at the time of diagnosis.



A reduction or loss of ChrA expression was determined to be a reliable indicator of tumor progression. ChrA expression can be used as an additional tool for the classification of pulmonary NENs according to the degree of malignancy.

Increased rates of TOP2A and PD-L1 are additional predictors of reduced life expectancy in patients with pulmonary NENs.

Detailed comprehensive assessment of pulmonary NENs' morphology and IHC profile is of great importance for understanding their biological characteristics and prognosis. The obtained results contribute to a deeper understanding of the nature of lung NENs, help to reconcile some of their controversial points, improve the quality of diagnostics, and offer recommendations for predicting the clinical course of the disease.

Additional IHC markers have been studied and scientifically substantiated for practical use to improve the morphological diagnosis of pulmonary NENs.

Increased rates of Ki-67, TOP2A, and PD-L1 in atypical lung carcinoids indicate their aggressiveness, which should cause increased vigilance among clinicians. Threshold values of Ki-67, TOP2A, PD-L1 expression were determined, which allows to increase the verification of moderately and poorly differentiated lung NENs and to predict the clinical course of the disease. The completed research contributes to a better understanding of the biological and behavioral features of lung NENs; implementation of the obtained results into practice allows to optimize the diagnostic process and with a high degree of probability to predict prognostic survival.

**Key words:** lung neuroendocrine neoplasms, complex morphological diagnosis, histological characteristics, immunohistochemical study, prognostic significance.

## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

### Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації

*Статті, опубліковані у наукових фахових виданнях України:*

1. L.M. Zakhartseva, H.Ye. Chytaieva. Predictive value of morphological features and proliferative markers (mitotic index, Ki-67, PNH3) in bronchopulmonary neuroendocrine tumors. Патологія. 2021, Т18, №3(53): 254–262. doi: 10.14739/2310-1237.2021.3.239530. (Web of Science). *(Автор здійснила збір матеріалу, разом зі співавтором провела гістологічне дослідження, провела імуногістохімічне дослідження, узагальнила та проаналізувала отримані дані, сформулювала висновки, підготувала статтю до друку).*
2. TOP2A expression as the essential predictive factor in lung neuroendocrine tumors. H.E. Chytaieva, L.M. Zakhartseva. Клінічна онкологія. — 2021, Т11, №3–4 (43–44): 1–6. doi: 10.32471/clinicaloncology.2663-466X.43-3.28396. *(Автор провела аналіз літератури, збір матеріалу, разом зі співавтором провела гістологічне дослідження, провела імуногістохімічне дослідження, узагальнила та проаналізувала отримані дані, сформулювала висновки, підготувала статтю до друку).*
3. Chytaieva H., Shkurupii B., Zakhartseva L. Correlation between expression of immunohistochemical markers and morphology in lung neuroendocrine neoplasms. Ukr. Scientific Medical Youth Journal. 2022; 1 (128): 6–18. doi: 10.32345/USMYJ.1(128).2022.6-18. *(Автор здійснила збір матеріалу, разом зі співавторами провела гістологічне та імуногістохімічне дослідження, підготувала ілюстративний матеріал, узагальнила та проаналізувала одержані дані, сформулювала висновки, підготувала статтю до друку).*
4. Рівень експресії Ki-67 як індикатор метастатичного ураження при нейроендокринних новоутвореннях легені. Читаєва Г.Є. Клінічна

онкологія. — 2022, Т12, №3–4 (47–48): 1–5. doi: 10.32471/clinicaloncology.2663-466X.47-3.29448.

*Інші статті:*

5. Chytaieva H.E., Zakhartseva L.M. PD-L1 expression in bronchopulmonary neuroendocrine tumors: correlation with morphological features and prognosis. Deutscher Wissenschaftsherold. German Science Herald, 2021; 2: 15–23. doi: 10.19221/202123. *(Автор здійснила відбір матеріалу, разом зі співавтором провела гістологічне дослідження, провела імуногістохімічне дослідження, узагальнила та проаналізувала отримані дані, сформулювала висновки, підготувала статтю до друку).*
6. L.M. Zakhartseva, H.E. Chytaieva, O.V. Artemov. Clinical case of non-typical metastasis of neuroendocrine lung carcinoma to the vascular membrane of the eye. Exp. Oncol., 2022; 44 (2): 169–173. doi: 10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-44-no-2.17969. (Scopus). *(Автор здійснила збір матеріалу, підготувала огляд літератури, разом зі співавторами провела гістологічне та імуногістохімічне дослідження, інтерпретацію даних клінічних досліджень, підготувала ілюстративний матеріал, оформила статтю до друку).*

**Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації**

*Тези виступів на конференціях:*

7. G.E. Chitaeva, L.M. Zakhartseva. Anonymous metastases of neuroendocrine tumors: definition of neoplasm's primary location according to morphological study and immuno-staining. Матеріали конф. молодих вчених «Фундаментальна медицина: інтегральні підходи до терапії хворих з онкопатологією» (м. Київ, 4–5 лютого 2019 р.) (тези). — Онкологія. 2019, Т21, №1:74.

8. Захарцева Л.М., Читаєва Г.Є. Оцінка прогностичної цінності панелі антитіл (хромогранін А, синаптофізин, СК7, СКпан, CD56, TTF-1 та Ki-67) при нейроендокринних пухлинах бронхолегеневої локалізації. Матеріали міжнар. наук.-практ. конф. «Сучасна патоморфологічна діагностика в клінічній практиці лікаря». Вінниця, 10–11 квітня 2019 р. (тези). — Матеріали наук-практ. конф. — Вінниця: Твори, 2019. — С.70–71.
9. Zakhartseva L.M., Chytaieva G.E., Guz' O.O., Zakhartsev Yu.O. Estimation of TTF-1, CK5/6, CK7, CD56, Chromogranin A, and Synaptophysin expression as an auxiliary aspect of neuroendocrine and other non-small cell lung tumors differential diagnosis in small biopsies. (31st European Congress of Pathology in Nice). Nice, France 7–11 September, 2019 (poster). 31st European Congress of Pathology in Nice (Final Programme) — P.101.
10. Читаєва Г.Є., Захарцева Л.М. Экспрессия top2α: дополнительный маркер оценки агрессивности нейроэндокринных опухолей бронхолегочной локализации. Міжнародна медична онлайн конф. «Наукові дослідження патологоанатомів України: досягнення та перспективи розвитку», Київ, 22–23 квітня 2021 р. (тези). — Ukr. Scientific Medical Youth Journal. 2021; suppl. 2(123):37–38.
11. Читаєва Г.Є. Захарцева Л.М. Особливості метастатичного враження при нейроендокринних карциномах легень, морфологічні і імуногістохімічні прогностичні фактор»; IV конф. Укр. дивізіону Інтернаціональної Академії Патології «Сучасна онкопатологія: морфогенез, патоморфологічна діагностика і прогноз пухлин», Запоріжжя, 16 вересня 2021. (усна доповідь); сертифікат учасника.
12. Читаєва Г.Є., Захарцева Л.М. Прогностична цінність морфологічних критеріїв та індексу проліферативної активності (рівень експресії Ki-67) при нейроендокринних пухлинах легень. онлайн конф. «Патологічна анатомія — основа всіх клінічних дисциплін: вимоги сьогодення». Київ, 18–19 лист., 2021 р. (тези). — Ukr. Scientific Medical Youth Journal. 2021; suppl. 3(126):24–25.

## ЗМІСТ

	Стор.
СПИСОК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ ТА СКОРОЧЕНЬ	23
ВСТУП	24
РОЗДІЛ 1. СУЧАСНИЙ ПОГЛЯД НА НЕЙРОЕНДОКРИННІ НОВОУТВОРЕННЯ БРОНХОЛЕГЕНЕВОЇ ЛОКАЛІЗАЦІЇ: ЕПІДЕМІОЛОГІЯ, КЛАСИФІКАЦІЯ, МОРФОЛОГІЯ, ПРОГНОЗ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)	31
1.1. Нейроендокринні пухлини легень: історичні аспекти	31
1.2. Класифікація нейроендокринних новоутворень легень: історичні аспекти та сучасні погляди	34
1.3. Епідеміологія та статистика при нейроендокринних новоутвореннях легень	40
1.3.1. Проблематика нейроендокринних новоутворень легень під час епідемії Covid-19	46
1.4. Особливості метастатичного ураження при нейроендокринних пухлинах легень	48
1.4.1. «Анонімні» метастази та метастази рідкісних локалізацій при нейроендокринних пухлинах легень	51
1.5. Морфологічна характеристика різних гістологічних підтипів нейроендокринних новоутворень бронхолегеневої локалізації	54
1.6. Імуногістохімічні маркери в діагностиці та визначенні прогнозу при нейроендокринних пухлинах легень	64
Висновки до розділу 1	74
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	76
2.1. Загальна характеристика матеріалів дослідження	76

2.2. Методи і методика дослідження	81
2.3. Статистична обробка результатів	85
Висновки до розділу 2	86
<b>РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ</b>	87
3.1. Загальна характеристика вибірки при нейроендокринних новоутвореннях легень	87
3.2. Гістологічна характеристика нейроендокринних новоутворень легень (за результатами дослідження архівного і клінічного матеріалу)	92
3.3. Кореляція між експресією імуногістохімічних маркерів і гістологічними характеристиками при нейроендокринних новоутвореннях легень	101
3.4. Прогностична цінність морфологічних особливостей та проліферативних маркерів (мітотичного індексу, Ki-67, PNH3)	110
3.5. Рівень експресії Ki-67 як індикатор метастатичного ураження при нейроендокринних новоутвореннях легень	119
3.6. Експресія TOP2A у нейроендокринних новоутвореннях легень, її значення	129
3.7. Експресія PD-L1: кореляція з морфологічними характеристиками і прогностичне значення	138
Висновки до розділу 3	150
<b>АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ</b>	155
<b>ВИСНОВКИ</b>	164
<b>ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ</b>	166
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ</b>	167
<b>ДОДАТОК А</b>	201
<b>ДОДАТОК Б</b>	202
<b>ДОДАТОК В</b>	204

**СПИСОК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ ТА СКОРОЧЕНЬ**

АС	— атиповий карциноїд
Grade	— ступінь диференціювання (зляжкiсностi)
LCNEC	— крупноклітинна нейроендокринна карцинома
PD-L1	— ліганд запрограмованої загибелі-1
РННЗ	— фосфогістон-3
SCLC	— дрібноклітинна (нейроендокринна) карцинома легень
ТС	— типовий карциноїд
TOP2A	— топоізомераза 2 $\alpha$
ДІ	— довірчий інтервал
ІГХ	— імуногістохімія
МІ	— мітотичний індекс
НЕК	— нейроендокринна карцинома (LCNEC і SCLC)
НЕН	— нейроендокринне новоутворення
НЕП	— нейроендокринна пухлина (ТС і АС)
ШКТ	— шлунково-кишковий тракт

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Нейроендокринні новоутворення (НЕН) — група рідкісних гетерогенних неоплазій, які походять з клітин дифузної нейроендокринної системи; їм притаманні різні гістологічні особливості, злоякісний потенціал, відмінності у клінічній поведінці та прогнозі. Найчастіше НЕН виявляють у шлунково-кишковому тракті (ШКТ) (62–67% випадків) і легнях (22–27%). [37, 83, 147]. За даними літератури, частка НЕН не перевищує 0,5–6% у структурі загальної онкопатології. На НЕН легень припадає 1–2% у загальній структурі онкологічних захворювань у дорослих і до 20–30% у загальній структурі злоякісних новоутворень легень [36, 75, 89, 147, 171, 189].

Частота виявлення НЕН за останні 30–40 років збільшилася з 1,09 до 6,98 на 100 тис. населення на рік (у різних країнах світу у 4,5–6,4 разу), поширеність патології оцінюють у 35 випадків на 100 тис. осіб [9, 84]. Така тенденція спостерігається в основному завдяки покращенню методів патоморфологічної та комплексної діагностики, а також підвищення обізнаності лікарів щодо цієї рідкісної патології [19, 37, 44, 196].

Епідеміологія, клінічна поведінка, лікування НЕН бронхолегеневої локалізації суттєво відрізняються від таких при решті злоякісних пухлин легень [14, 188]. Враховуючи це, встановлення діагнозу НЕН легень може виявитися непростим завданням [41, 48]. Більшість НЕН легень виявляють запізно, на поширеній стадії, у понад 40% пацієнтів на момент звернення наявні метастази, зазвичай — множинні [177].

НЕН легень демонструють гетерогенні морфологічні, ІГХ і молекулярні характеристики, а також різну клінічну та біологічну «поведінку» [39, 49, 176]. Згідно сучасної класифікації, НЕН бронхолегеневої локалізації розподіляють на 4 гістологічних варіанти — від відносно доброякісних новоутворень (ТС і АС) до доволі агресивних карцином з дуже поганим прогнозом (LCNEC і SCLC) [16, 75, 87, 110, 159, 227].



Гістологічне дослідження НЕН обов'язково потребує застосування ІГХ тестів як для верифікації нейроендокринного компоненту, так і для визначення ступеня злякисності. Не треба забувати, що легень є органом-мішенню для метастазування пухлин з інших органів, тому ІГХ-дослідження допомагає встановити походження пухлини. ІГХ-дослідження є особливо важливим у випадку малих або *crushed* біопсій, які складають понад 50% усіх зразків при НЕН легень. Але оцінка результатів ІГХ-досліджень в цій групі є непростим завданням. Експресія ІГХ-маркерів є досить варіабельною у різних гістологічних підтипах бронхолегеневих НЕН, часто дані є описовими, їх кореляція з морфологічними ознаками вивчена недостатньо. Актуальним є вивчення кореляції між експресією біомаркерів і ключовими морфологічними характеристиками у НЕН легень, а також визначення статистично достовірних діагностичних і прогностичних показників .

Також відкритими залишаються питання термінологічної неузгодженості, нюансів класифікації НЕН легень, що вносить певну невизначеність у розуміння їх біології, діагностику та прогностику і спричиняє непорозуміння між науковцями, морфологами та клініцистами. Крім того, дослідження присвячені НЕН легень, зазвичай виконані на невеликій кількості спостережень, їх дані є досить обмеженими й уривчастими і нерідко суперечливими [43, 191, 230].

Потрібне визначення додаткових морфологічних чинників для чіткого розмежування відносно доброякісних і агресивних гістологічних підтипів НЕН легень, а також додаткових прогностичних критеріїв для коректної, своєчасної діагностики, оцінки перебігу захворювання та тривалості життя пацієнта.

### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами**

Дисертаційна робота виконана в рамках науково-дослідної роботи кафедри патологічної анатомії Національного медичного університету імені О.О. Богомольця «Розробка гістологічних і молекулярно-біологічних критеріїв диференційної діагностики пухлин та передпухлинних змін в

органах і їх прогностичне значення» (№ державної реєстрації 0119U10131). Дисертант є виконавцем однієї з підтем НДР.

**Мета дослідження:** визначити додаткові морфологічні та імуногістохімічні фактори для діагностики та прогнозу клінічного перебігу нейроендокринних новоутворень легень.

**Задачі дослідження:**

1. Вивчити показники захворюваності, ступені злоякісності, метастазування нейроендокринних новоутворень легень.
2. Проаналізувати морфологічні особливості (некроз, мітотичний індекс) нейроендокринних новоутворень легень та їх кореляцію з виживаністю хворих.
3. Визначити кореляцію між мітотичним індексом та експресією Ki-67, PNH3 у нейроендокринних новоутвореннях легень.
4. Оцінити прогностичну цінність мітотичного індексу, Ki-67, PNH3 у нейроендокринних новоутвореннях легень.
5. Визначити кореляцію між експресією ChrA, TTF-1, CK7 та ступенем диференціювання нейроендокринних пухлин легень і їх клінічним перебігом.
6. Оцінити прогностичну цінність експресії імуногістохімічного маркера TOP2A.
7. Визначити експресію маркера PD-L1 у нейроендокринних новоутвореннях бронхолегеневої локалізації: її кореляцію з морфологічними показниками та прогностичне значення.
8. Запропонувати алгоритм використання морфо-гістохімічних показників для діагностики та оцінки прогнозу нейроендокринних новоутворень легень.

*Об'єкт дослідження* — нейроендокринні новоутворення легень.

*Предмет дослідження* — морфологічні та імуногістохімічні особливості в діагностиці та прогнозуванні перебігу нейроендокринних новоутворень легень.

*Методи дослідження:* загальноклінічні, гістологічні, імуногістохімічні, статистичні.

### **Наукова новизна одержаних результатів**

Вперше проведена комплексна оцінка морфологічних особливостей та експресії TOP2A, PNH3, PD-L1 в НЕН легень з метою узгодження їх суперечливих характеристик, визначення додаткових діагностичних і прогностичних критеріїв.

Підтверджено, що МІ та індекс проліферації Ki-67 є основними критеріями для визначення ступеня злоякісності (грейдингу) НЕН легень.

Вперше визначено, що зниження або втрата експресії ChrA є надійним свідченням пухлинної прогресії. Експресія ChrA може бути використана як додатковий інструмент для розподілу НЕН легень за ступенем злоякісності.

Доведено, що рівні експресії Ki-67 і TOP2A можуть бути використані в якості додаткового предиктора метастатичного ураження лімфатичних вузлів на момент встановлення діагнозу. Підвищення рівня TOP2A і PD-L1 без імунотерапевтичного лікування є додатковим предиктором скорочення тривалості життя пацієнтів при НЕН легень.

Отримані результати дозволяють краще зрозуміти природу НЕН легень, узгодити деякі її суперечливі моменти, розробити рекомендації щодо прогнозування перебігу захворювання на підставі результатів морфологічного та ІГХ-досліджень.

### **Практичне значення**

Проаналізовані існуючі міжнародні рекомендації щодо визначення ступеня злоякісності НЕН легень на великій вибірці (113 випадків), визначена статистична значущість морфологічних показників (некроз, мітотичний індекс, метастази в лімфатичних вузлах) та експресії Ki-67, ChrA для прогнозування клінічного перебігу захворювання на основі визначення загальної виживаності.

Вперше вивчена експресія TOP2A і PNH3: доведено, що високий рівень експресії TOP2A (>13%) є чутливим показником агресивного перебігу НЕК легень, натомість рівень експресії PNH3 не впливає на показники виживаності. Визначено, що експресії PD-L1 є поганим прогностичним фактором при низько диференційованих НЕК легень без застосування імунотерапії.

За результатами дослідження уточнено алгоритм диференціації (грейдингу) НЕН легень, а саме наявність великих і поширених вогнищ некрозу,  $MI \geq 7$  мітозів у 10 полях зору, зниження або зникнення експресії ChrA, експресія Ki-67 >18%, TOP2A >13%, PD-L1 (без імунотерапії) є достовірними показниками агресивного перебігу захворювання і скорочення виживаності до 8 міс.

### **Впровадження**

Практичні рекомендації, які базуються на основних положеннях дисертації, впроваджено у практичну діяльність патологоанатомічного відділення Київського міського клінічного онкологічного центру. Матеріали дисертаційної роботи включені до лекційного курсу кафедри патологічної анатомії Національного медичного університету імені О.О. Богомольця. Робота виконана в рамках науково-дослідної роботи кафедри патологічної анатомії Національного медичного університету імені О.О. Богомольця «Розробка гістологічних і молекулярно-біологічних критеріїв диференційної діагностики пухлин та передпухлинних змін в органах і їх прогностичне значення», № державної реєстрації 0119U10131.

### **Особистий внесок здобувача**

Дисертаційна робота є самостійно виконаним дослідження автора. Спільно з науковим керівником визначені тема, мета і завдання. Дисертантом виконаний інформаційний пошук, збір, обробка матеріалу, проведені гістологічне та імуногістохімічні дослідження, статистична обробка матеріалів, на підставі чого зроблені висновки щодо можливості використання

додаткових прогностичних чинників при нейроендокринних новоутвореннях бронхолегеневої локалізації. Всі розділи дисертації написані автором самостійно. У наукових роботах, надрукованих у співавторстві, дисертанту належить фактичний матеріал, його участь у публікаціях є визначальною. Права співавторів публікацій дотримані, конфлікт інтересів відсутній. Матеріали даної роботи не були використані у інших дисертаціях.

### **Апробація результатів дослідження**

Основні положення та результати дисертаційної роботи оприлюднені на конференції молодих вчених «Фундаментальна медицина: інтегральні підходи до терапії хворих з онкопатологією» (Київ, 4–5 лютого 2019 р.); міжнародній науково-практичній конференції «Сучасна патоморфологічна діагностика в клінічній практиці лікаря» (Вінниця, 10–11 квітня 2019 р.); 31st European Congress of Pathology in Nice (Nice, France 7–11 September, 2019); міжнародній медичній онлайн конференції «Наукові дослідження патологоанатомів України: досягнення та перспективи розвитку» (Київ, 22–23 квітня 2021 р.); IV конференції Українського дивізіону Інтернаціональної Академії Патології «Сучасна онкопатологія: морфогенез, патоморфологічна діагностика і прогноз пухлин» (Запоріжжя, 16 вересня 2021); онлайн конференції «Патологічна анатомія — основа всіх клінічних дисциплін: вимоги сьогодення» (Київ, 18–19 листопада, 2021 р.).

### **Публікації**

Результати дисертації опубліковані у 12 наукових працях, з них 4 наукові статті (в тому числі 1 — у журналі, що індексується Web of Science, 3 — у фахових виданнях України), а також доповідь-постер на Європейському конгресі патологів.

### **Об'єм і структура дисертації**

Робота викладена на 205 сторінках машинописного тексту українською мовою. Складається з анотації, змісту, вступу, трьох розділів, аналізу та

узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел, додатків. Робота ілюстрована таблицями, рисунками, мікрофотографіями. Список використаних джерел включає найменування вітчизняних і зарубіжних джерел, містить 252 посилання.

# РОЗДІЛ 1

## СУЧАЧНИЙ ПОГЛЯД НА НЕЙРОЕНДОКРИННІ НОВОУТВОРЕННЯ БРОНХОЛЕГЕНЕВОЇ ЛОКАЛІЗАЦІЇ: ЕПІДЕМІОЛОГІЯ, КЛАСИФІКАЦІЯ, МОРФОЛОГІЯ, ПРОГНОЗ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

### 1.1. Нейроендокринні пухлини легень: історичні аспекти

Впродовж останніх 3–4 десятиліть відзначається неабияка зацікавленість у НЕН клініцистів (перш за все онкологів, хірургів, ендокринологів), патологів, що зумовлене збільшенням частоти виявлення цих пухлин. Однак існують і певні труднощі раннього їх розпізнавання, в основному через недостатню обізнаність лікарів різних спеціальностей щодо особливостей клінічного перебігу таких новоутворень, часто — малодоступність ПХ, молекулярно-генетичних, сучасних інструментальних методів дослідження, а також розбіжності в трактуванні клініко-морфологічних критеріїв, прогностичних чинників [21, 48, 174, 193].

Складно визначити якесь інше захворювання, крім НЕН, для якого б так часто і суттєво змінювалися класифікації, терміни і протоколи [72]. Недотримання термінологічної наступності та відповідні труднощі у адаптації сучасної класифікації НЕН легень спричиняють певну неузгодженість і навіть «хаос» у клінічній практиці та наукових дослідженнях.

Власне, проблема термінології сягає своїм корінням історії вивчення НЕН.

Вважається, що Langhans T. (1887 р.) першим описав карциноїдну пухлину на гістологічному рівні. Однак доповідь про сам клінічний феномен приписують Lubarsch O. (1888 р.), який під час розтину у двох пацієнтів у дистальному відділі порожньої кишки виявив множинні підслизові утворення [45, 249].

Сам термін «карциноїд» (грецьк. *karzinos* — ракова пухлина, *oidos* — подібність) був запропонований Oberdorfer S. (1907 р.) для новоутворень тонкої кишки, що морфологічно були подібними до аденокарциноми, але характеризувалися більш торпідним перебігом; хоча 20 років потому автор відмовився від помилкового уявлення про доброякісність карциноїдів, зазначивши їх здатність проявляти злоякісні властивості та метастазувати. У 1914 р. Masson P. висунув припущення про нейроендокринну природу карциноїдів. В подальшому в роботах Feyrter F. і Pearse A. була запропонована концепція клітин дифузної ендокринної системи, які походять з різних органів і дають початок карциноїдам [28, 209].

Ентерохромафінні клітини в стінці кишечника (які є нейроендокринними за своєю природою) були відкриті у 1897 р. видатним вітчизняним гістологом Кульчицьким М.К. Згодом виявилось, що такі клітини наявні у слизовій оболонці багатьох органів і є структурною ланкою високоорганізованої дифузної нейроендокринної (або APUD — Amine Precursor Uptake Decarboxylase) системи. Медіатори і гормони, що синтезуються клітинами дифузної нейроендокринної системи, беруть участь у регуляції обміну вуглеводів, кальцію, електролітів, впливають на тонус м'язів і судинної стінки, всмоктування і секрецію у ШКТ, диференціювання та проліферацію різних типів клітин [249].

При проведенні подальших досліджень з'ясувалося, що ендокринні клітини різних локацій відрізняються за можливістю депонування попередників біогенних амінів і синтезу специфічних поліпептидів (гормонів), проте, спільною їх рисою є експресія таких нейроендокринних маркерів як хромогранін А (ChrA) і синаптофізін (Syn). Це й зумовило виникнення термінів «нейроендокринна система» та, відповідно, «нейроендокринні пухлини». І хоча більшість нейроендокринних пухлин мають подібні структурні риси, біологічно вони є досить різноманітними та потребують різних клінічних підходів [105].



Джерелом НЕН легень є клітини дифузної нейроендокринної системи, розташовані в слизовій оболонці бронхіального дерева, які мають характерні цитоплазматичні вирости, еозинофільне забарвлення та позбавлені ворсинок [144, 249]. За даними літератури, такі клітини є чутливими та ефективними «реостатами» у стінці дихальних шляхів, які отримують, інтерпретують та реагують на стимули з оточуючого середовища [18]. У пренатальному онтогенезі нейроепітеліальні тільця сприяють нормальному розвитку легень плоду. Їх стратегічне розташування у апікальній частині клітин в ділянці біфуркації трахеї та їх аферентно-еферентна іннервація доводять, що ці структури забезпечують внутрішньоклітинну хеморецепцію, яка точно регулює баланс між вентиляцією та перфузією [250]. Однак на сьогоднішній день участь нейроендокриноцитів легень у процесах регенерації та канцерогенезу вивчена недостатньо.

Карциноїдні пухлини легень вперше були описані бронхологами Janson С. (1917 р.) і Hamperl Н. (1937 р.), які назвали їх «бронхогенними аденомами» і віднесли до доброякісних новоутворень. Але в процесі спостереження таких пухлин виникло припущення про їх злоякісність, яке в подальшому підтвердилося морфологічно. У 1972 р. Arrigoni М. запропонував розрізняти типовий і атипичний карциноїди. У 1970-х рр. НЕН легень розподілені на три категорії: ТС, АС і SCLC. Згідно класифікації ВООЗ 1999 р. LCNEC вважали варіантом крупноклітинної карциноми легень, але у наступній редакції LCNEC віднесені до НЕН. На сьогоднішній день серед НЕН легень виділяють чотири категорії: ТС, АС, LCNEC і SCLC [95].

На основі подібності імунофенотипу клітин ендокринної та нервової тканини у 2000 р. експерти ВООЗ запропонували змінити термін «карциноїд» на «нейроендокринна пухлина». Наразі термін «карциноїд» використовується лише для високо і помірно диференційованих нейроендокринних новоутворень легень [108, 131, 237]. Проте, й дотепер зберігається певна плутанина в номенклатурі та діагностиці, оскільки термін «карциноїд» широко

використовується у літературі (зокрема онкологами та хірургами) як синонім високо диференційованих НЕН різної локалізації.

## **1.2. Класифікація нейроендокринних новоутворень легень: історичні аспекти та сучасні погляди**

Найбільша частина НЕН (понад 60%) походить з ШКТ — переважна локалізація — сліпа (17,1%) і пряма (16,3%) кишки. Від 22 до 30% НЕН трапляються у бронхо-легеневій системі [65, 107, 190, 192].

Ще у 1963 р. Williams E. і Sandler M. запропонували класифікацію з урахуванням закономірностей ембріогенезу з розподілом за відділами первинної кишки, з яких може виникнути карциноїд. Так, до передньокишкового типу (foregut) були віднесені НЕН тимуса, бронхо-легеневої локалізації, стравоходу, шлунку, підшлункової залози, проксимального відділу дванадцятипалої кишки. У НЕН цього типу переважно відсутня секреторна активність або вона досить низька, відповідно, у пацієнтів не спостерігається розгорнутої картини карциноїдного синдрому. Нефункціональні НЕН зазвичай діагностують на більш пізніх стадіях захворювання, ніж функціональні, також для них характерний більш агресивний перебіг [108].

Вивчення особливостей термінології та ступенів малігнізації НЕН, запропонованих ВООЗ, Європейським науковим товариством з вивчення НЕН (ENETS), Американським комітетом з вивчення раку (AJCC) та іншими провідними організаціями, показало, що жодна з існуючих класифікацій не може вважатися універсальною. Впродовж останнього десятиріччя неодноразово здійснювався перегляд існуючих класифікацій НЕН з урахуванням їх органної локалізації, ступенів диференціювання, біологічної поведінки, клінічних проявів, а також комплексу найбільш значущих прогностичних чинників [95, 169, 214].

У 1970 р. НЕН легень були класифіковані за 3 категоріями: ТС, АС і SCLC [95].

В основу сучасної класифікації легеневих НЕП, прийнятої ВООЗ у 1991 р., покладений розподіл за гістологічними ознаками на ТС, АС, LCNEC і SCLC. Але спочатку, у 1970-х рр. до НЕН бронхо-легеневої локалізації відносили тільки ТС, АС і SCLC. Згодом визначення LCNEC зазнало перегляду, і ці новоутворення були включені до НЕН легень [197].

Класифікація ВООЗ для НЕН легень 2004 р. враховувала їх морфологічні характеристики, акуратний підрахунок мітозів та наявність і поширеність вогнищ некрозу в тканині пухлини. Високо- помірної- та низько диференційовані НЕП легень були розподілені на 4 гістологічних типи: ТС, АС, LCNEC і SCLC (табл. 1.2.1). Ki-67 позиціонувався як допоміжний інструмент в діагностиці НЕН легень. Але дана редакція була орієнтована тільки на резекції; LCNEC описана в одному розділі з крупноклітинною карциномою легень. Проведення ІГХ, визначення експресії нейроендокринних маркерів (хоча б одного з них) були рекомендовані тільки для LCNEC. Дослідники наголошували на необхідності визначення додаткових ІГХ і молекулярних маркерів, які могли б слугувати допоміжними діагностичними та прогностичними інструментами, а також потенційними терапевтичними мішенями при НЕН легень [175, 195].

У 2010 р. експертами ВООЗ запропонована нова класифікація. Загальний для усіх новоутворень нейроендокринного походження термін «нейроендокринна пухлина» (НЕП) був замінений на «нейроендокринна неоплазія» (НЕН). Діагностика НЕН відтепер базувалася на комбінації морфологічних параметрів та експресії нейроендокринних і органоспецифічних маркерів. Проте, класифікація при НЕН легень залишалася майже копією такої при НЕН ШКТ (табл. 1.2.2), що спричиняло термінологічні нестыковки та діагностичні розбіжності [146, 245].

Редакція 2015 р. вперше була адаптована для діагностики НЕН легень у біопсійному матеріалі (табл. 1.2.3). НЕН бронхолегеневої локалізації вперше були виділені у окремий токсонічний блок, їм вперше присвячений окремий розділ, наряду з аденокарциномою, плоскоклітинною та крупноклітинною карциномою легень. Вперше рекомендовані рівні експресії Ki-67 для розмежування карциноїдів і низько диференційованих НЕН легень, зокрема, у матеріалі малих біопсій. Також у класифікації 2015 р. зазначалося, що різноманітні молекулярні пошкодження частіше трапляються у LCNEC та SCLC, на відміну від TC і AC, в яких вони є досить подібними і виникають набагато рідше. Однак, спеціалісти визнавали, що у класифікації 2015 р. залишалися певні термінологічні неточності, невідповідність у діагностичній відтворюваності, неузгодженість гістологічних параметрів в межах однієї категорії пухлин, що вимагало глобального переосмислення НЕН легень, в якому важлива роль відводилася саме коректній класифікації [147, 156, 157, 181, 195, 214].

Чітка класифікація НЕН бронхолегеневої локалізації є наріжним каменем для коректної діагностики, забезпечення оптимального клінічного ведення пацієнтів та відправною точкою для будь-якого дослідницького аналізу [189].

Останній перегляд класифікації ВООЗ для НЕН ШКТ здійснений у 2019 р., а НЕН легень — лише 3 роки потому, у 2021 р. Так, високо і помірно диференційовані пульмонарні НЕН (TC, AC) віднесені до нейроендокринних пухлин (НЕП), а низько диференційовані (LCNEC, SCLC) — до нейроендокринних карцином (НЕК); велика увага приділяється молекулярній патології. Вкотре змінилися порогові значення MI і Ki-67 для різних гістологічних підтипів НЕН легень, що знову ж таки ускладнює оцінку і порівняння результатів раніше проведених досліджень, в т.ч. епідеміологічних (в яких грейдинг здійснювався за більш ранніми класифікаціями). Однак, нові показники Ki-67 є більш «реальними» з точки зору практикуючого лікаря і

майже не «перекриваються» у різних гістологічних варіантах НЕН легень, що сприяє їх більш акуратному диференціюванню. Розподіл НЕН легень на НЕП і НЕК має важливе клінічне значення з урахуванням суттєвих відмінностей у їхньому «молекулярному ландшафті», очікуваної виживаності та варіантів терапії [130, 131].

Табл. 1.2.1. Класифікація бронхолегеневих НЕН, 2004 р. (за Pavel M., et al., 2013 [154]).

НЕН бронхолегеневої локалізації / тимуса		к-ть мітозів $\times 10$ HPF	вогнища некрозу
ТС		< 2	відсутні
АС		2–10	наявні
NEC	крупноклітинна	> 10	великі
	дрібноклітинна		

Табл. 1.2.2 Класифікація НЕН бронхолегеневої локалізації, 2010 р. (за Nunez-Valdovinos B., et al. 2018; Pavel M., et al., 2013 [145, 154]).

Диференціювання	Grade	Ki-67	К-ть мітозів	Діагноз
Диференційовані	Low grade	< 2%	< 2 $\times 2$ mm <sup>2</sup> , некрози відсутні	ТС
	Intermediate grade	3–20%	2–10 мітозів 2 mm <sup>2</sup> або вогнища некрозу	АС
Погано диференційовані	High grade	> 20%	> 11 мітозів $\times 2$ mm <sup>2</sup>	LCNEC SCLC

Табл. 1.2.3. Критерії ВООЗ для діагностики НЕН легень (2015 р.). (за Naheed S., et al., 2019; Travis W.D., et al., 2015 [137, 214]).

Критерії	ТС	АС	LCNEC	SCLC
Мітози, $\times 2$ mm <sup>2</sup>	< 2	2–10	> 10	> 10
Некрози	відсутні	якщо наявні, то дрібні фокальні або «пунктирні»	екстенсивні	екстенсивні
Морфологія	органоїдна	органоїдна	органоїдна	дрібні клітини
Ступінь диференціювання	високий	помірний	низький	низький
Ki-67	до 5%	до 20%	40–80%	50–100%

Згідно сучасної класифікації ВООЗ гетерогенні НЕН бронхо-легеневої локалізації (2021) розподілені на 4 гістологічних варіанти, що відрізняються за морфологічними, ІГХ, генетичними характеристиками, клінічним перебігом і прогнозом. До НЕН низького і проміжного ступенів злоякісності віднесені типовий (ТК) і атипичний карциноїди (АК); LCNEC і SCLC — є низько диференційованими агресивними пухлинами (рис. 1.2.1, табл. 1.2.4).



Рис. 1.2.1. Морфологічні критерії класифікації НЕН бронхо-легеневої локалізації (адаптовано за Delektorskaya V.V., 2017; Naheed S., et al., 2019; Melosky B., 2017; WHO Classification of Thoracic Tumors., 2021) [46, 129, 137, 236].

Аналіз НЕН зазвичай розпочинається з розпізнавання характерної органодної моделі росту («гнізда», «розетки», «палісади» тощо), виявлення дрібногранулярного хроматину («сіть з перцем»), дослідження доповнює ІГХ-визначення експресії ключових нейроендокринних (хромогранін А, синаптофізин) і епітеліальних маркерів. Однак зазначені характеристики зазвичай спостерігають у високо диференційованих НЕН, у міру збільшення

ступеня злоякісності пухлини їх вираженість може суттєво зменшуватися. Гістологічне диференціювання доповнює рівень проліферативної активності, який корелює з агресивністю новоутворення та прогнозом захворювання.

Табл. 1.2.4. Сучасні базові критерії для грейлінгу НЕН бронхолегеневої локалізації

Ступінь злоякісності / Grade	Критерії			
	Мітози ( $\times 2 \text{ мм}^2$ )	Вогнища некрозу	Індекс Ki-67, %	
			2015 р.	2021 р.
Низький / Grade 1 (TK)	0–1	відсутні	$\leq 5\%$	до 5%
Помірний / Grade 2 (AK)	20–10	фокальні	$\leq 20\%$	до 30%
Високий / Grade 3 (LCNEC, SCLC)	$>10$	великі, численні	$>40\text{--}50\%$	30–100%

Багато одночасно використовувати обидва маркери проліферації (МІ та рівень експресії Ki-67), що суттєво полегшує діагностику, зокрема у біопсійному матеріалі, а також у випадках, коли існує невідповідність між гістологічною картиною та МІ [222].

Індекс проліферації Ki-67 є дуже корисним критерієм при НЕН, принаймні у двох різних практичних застосунках. По-перше, у малих і краш-біопсіях, в яких результати морфологічного дослідження нерідко суттєво утруднені та не є достовірними, показник Ki-67 допомагає у диференційній діагностиці високо і низько диференційованих НЕН легень. По-друге, за даними досліджень, Ki-67 виявився значущим прогностичним фактором для карциноїдних пухлин і його рівень має бути зазначений у заключенні патолога. Однак дотепер немає чіткої узгодженості між різними дослідниками щодо рівня Ki-67 та імплементації цього показника у класифікацію НЕН бронхо-легеневої локалізації за ступенем злоякісності. За даними літератури, карциноїди з високим рівнем проліферативної активності (Ki-67 у проміжку від 10 до 20%) нерідко демонструють морфологічні та клінічні риси, які більше притаманні високо злоякісним НЕК легень [100, 110, 126].

### 1.3. Епідеміологія та статистика при нейроендокринних новоутвореннях легень

Досліджень, присвячених НЕН, останніми роками немало, але більшість з них є ретроспективними або ретроспективно-проспективними, одноцентровими, вибірки зазвичай невеликі, а отримані дані нерідко фрагментарні й досить суперечливі (табл. 1.3.1).

Табл. 1.3.1. Приклади дослідження НЕН легень в світі.

№	автори / публікація	країна	тип дослідження	роки	кількість спостережень
1	Ichiki Y., et al.; 2018	Японія	одноцентрове	1978–2016	105
2	Tsuruoka K., et al.; 2017	Японія	одноцентрове	1982–2010	227
3	Kasajima A., et al.; 2018	Японія, Німеччина	10 установ	1996–2015	242
4	Pasala U.J.S., et al.; 2021	Індія	одноцентрове	2016–2019	53
5	Orozco-Morales M., et al.; 2021	Мексика	одноцентрове	2012–2020	51
6	Thuillier P., et al.; 2021	Італія	одноцентрове	2012–2020	46
7	Dudnik E., et al.; 2021	Ізраїль	4 центри	2009–2019	125
8	Rosner E., et al.; 2021	Німеччина	одноцентрове	1998–2014	97
9	Galvano A., et al.; 2021	Італія	одноцентрове	2002–2018	120
10	Rekhtman N., et al.; 2019	США	одноцентрове	2011–2016	66

Крім того, у багатьох країнах, в тому числі, в Україні [252] відсутні статистичні дані щодо НЕН, їх питомої ваги в структурі загальної онкопатології, частоти виявлення в залежності від анатомічної локалізації, показників смертності, що суттєво утруднює спроби оцінити та зіставити результати досліджень, а також розробити коректний алгоритм діагностики та лікування.



НЕН вважають рідкісними пухлинами; діагностика цієї патології розвивалася за умов відсутності єдиної класифікації та невідповідності реєстру пухлин у різних регіонах світу. За даними літератури, захворюваність на НЕН у різних країнах коливається від 2 до 8 випадків на 100 тис. населення [183]. Впродовж останніх 30 років частота виявлення НЕН збільшилися майже у 6,4 разу. В структурі загальної онкопатології на НЕН припадає 2,2%. Досить детальні показники доступні по США і Норвегії, де у 1973–2002 рр. були проведені найбільші масштабні епідеміологічні дослідження. Так, за даними ракового реєстру США, захворюваність на НЕН зростає з 1,09 нових випадків на 100 тис. осіб у 1973 р. до 5,25 на 100 тис. осіб у 2004 р. У Норвегії показник захворюваності змінився з 13,5 на 100 тис. населення у 1993 р. до 21,6 на 100 тис. населення у 2010 р.; щорічний приріст захворюваності становив для чоловіків 5,1%, для жінок — 2,1% [42, 44, 201]. Точні причини такого зростання дотепер невизначені, але, ймовірно за все, це удосконалення методів діагностики та підвищена онкологічна настороженість (скринінгові дослідження).

Проте, незважаючи на досягнення сучасної медицини, нерідко НЕН виявляють на поширеній стадії, переважна більшість з них представлені низько диференційованими формами. У понад 50% пацієнтів на момент встановлення діагнозу наявні регіонарні, а у 27% — віддалені метастази [42, 86, 151, 204, 246, 251].

На думку епідеміологів, канцер-реєстри — обов'язкова ланка програми контролю ситуації навколо злоякісних новоутворень. Онкологів і суміжних спеціалістів цікавить проблема НЕН з метою визначення частоти їх виникнення, географії поширення, гендерних і вікових особливостей, методів лікування та їх ефективності. Однак статистичні дані одного або кількох лікувальних закладів, на жаль, неможна коректно перенести на всю популяцію онкологічних хворих і зробити висновки про поширеність НЕН в країні, хоча

за відсутності даних у канцер-реєстрі така інформація дозволяє створити модель (хоча і фрагментарну) існуючої ситуації.

За даними сайту Global Cancer Observatory [Global Cancer Observatory \(iarc.fr\)](http://GlobalCancerObservatory.iarc.fr) [91], у 2020 р. рак легень за частотою виявлення посідав III місце серед усіх випадків онкологічних захворювань (22,4 на 100 тис. населення), поступаючись лише раку молочної (47,8 на 100 тис.) та передміхурової (30,7 на 100 тис.) залози. Проте, смертність при раку легень (18,0 на 100 тис. населення) вийшла у рейтингу на I місце, значно перевищуючи показники при злоякісних новоутвореннях інших локацій (II місце — смертність від раку молочної залози (13,6 на 100 тис.), III місце — від колоректального раку (9,0 на 100 тис.)). У чоловіків рак легень стабільно займає перший рядок у рейтингу захворюваності (31,5 випадків на 100 тис. населення) та смертності (25,9 на 100 тис.). У жінок захворюваність на онкопатологію бронхолегеневої локалізації (14,6 випадків на 100 тис. населення) поступалася такій лише при раку молочної залози (47,8 на 100 тис.) і колоректальному раку (16,2 на 100 тис.). А смертність при раку легень незначно поступалася такій при раку грудей (11,2 і 13,6 на 100 тис., відповідно) (рис. 1.3.1).

Estimated age-standardized incidence and mortality rates (World) in 2020, worldwide, both sexes, all ages

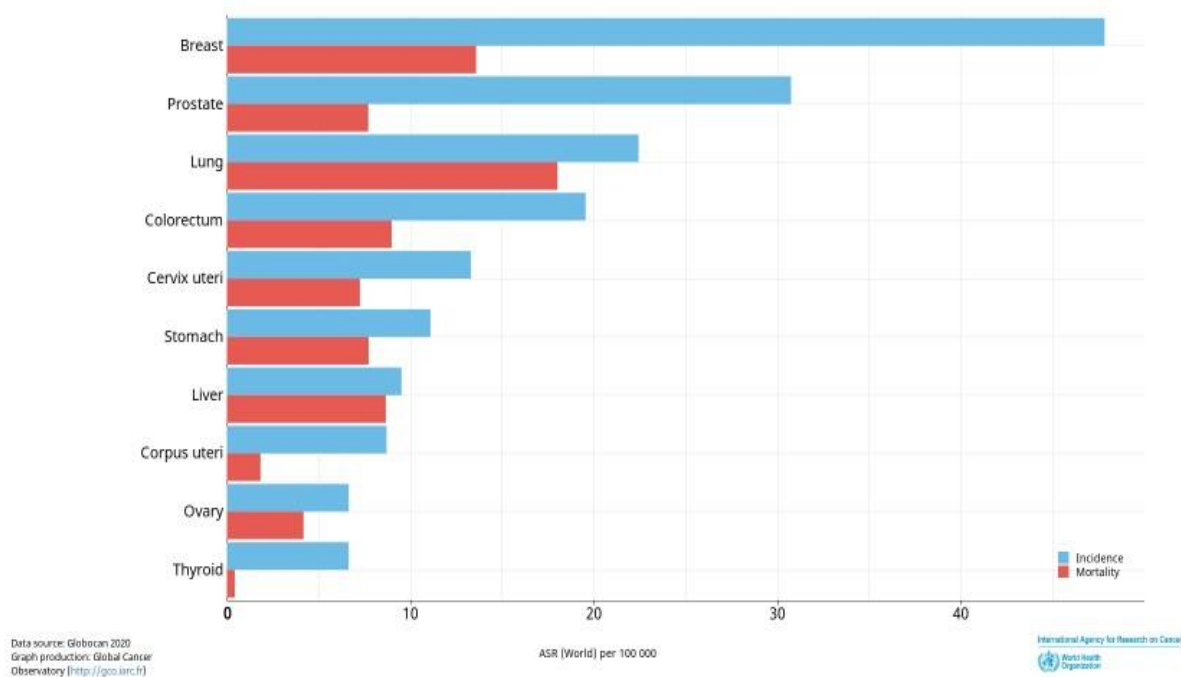
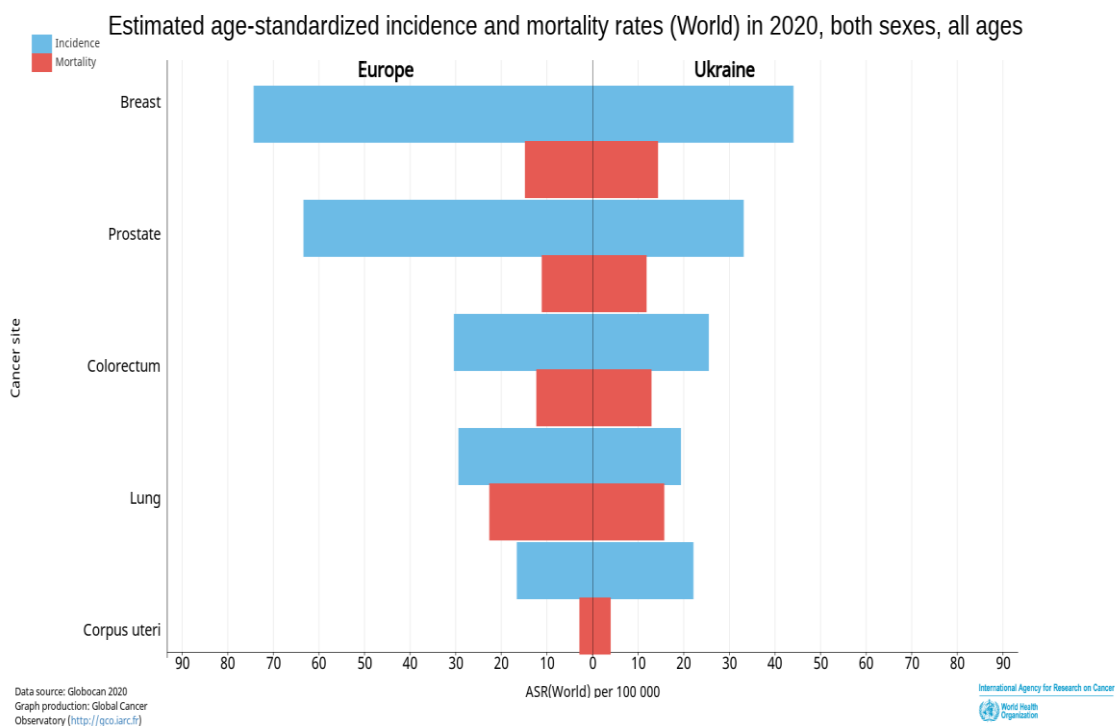


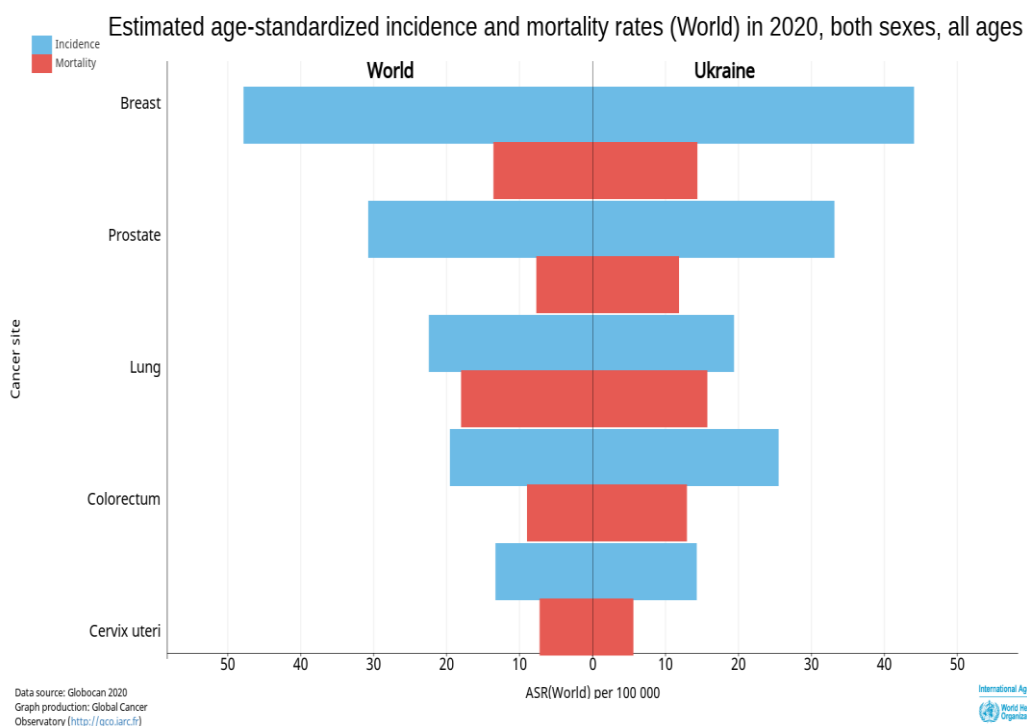
Рис. 1.3.1. Показники захворюваності та смертності населення обох статей віком від 0 до 85+ років у світі за 2020 р. За даними сайту [Global Cancer Observatory \(iarc.fr\)](http://GlobalCancerObservatory(iarc.fr)) [91].

На рис. 1.3.2 наведене порівняння показників захворюваності та смертності при раку легень у Європі та Україні станом на 2020 р.

За даними Національного канцер-реєстру України, у 2020 р. захворюваність на рак легень становила 26,8 на 100 тис. населення (співвідношення чоловіки / жінки 46,0 / 10,2 на 100 тис.); смертність — 22,6 випадків на 100 тис. населення (співвідношення чоловіки / жінки 39,4 / 8,0) на 100 тис. З числа вперше виявлених випадків 31,8% — III стадія захворювання, 42,2% — IV; не прожили й 1 року з виявлених у 2019 р. — 57,9% хворих. Показник морфологічно верифікованих випадків далекий від оптимістичного — лише 60,4% [251].



A



Б

Рис. 1.3.2. Захворюваність (А) та смертність (Б) при основних онкологічних захворюваннях у світі у 2020 р., за даними сайту [Global Cancer Observatory \(iarc.fr\)](http://Global Cancer Observatory (iarc.fr)) [91].

На рідкісні НЕН, за даними літератури, припадає близько 2% у структурі первинних пухлин бронхо-легеневої локалізації [67, 84, 215].

Це самостійна категорія злоякісних новоутворень, яким притаманні спільні морфологічні та біологічні нейроендокринні характеристики, що виділяють їх з-поміж інших пухлин легень. НЕН легень, так само як і НЕН ШКТ та інших локалізацій, утворюють вкрай різномірну групу у відношенні біологічної поведінки та клінічних проявів [46].

На жаль, у статистичній звітності Global Cancer Observatory [Global Cancer Observatory \(iarc.fr\)](http://GlobalCancerObservatory.iarc.fr) [91] не фігурують НЕН як такі. Інформації про НЕН бронхо-легеневої локалізації також немає. Наразі в Україні немає офіційних статистичних даних щодо захворюваності на НЕН [252]; ці пухлини не фігурують у Національному канцер-реєстрі, що суттєво ускладнює оцінку їх поширеності та дотримання стандартів діагностичного алгоритму й аналіз результатів лікування.

Наявні у світі дані є досить обмеженими (локальними), і відривчастими. Частота виявлення НЕН, у тому числі, бронхо-легеневої локалізації, у різних країнах світу різниться, проте, продовжує збільшуватися, зокрема у США та країнах Західної Європи [43, 191].

Так, за даними реєстру SEER (Surveillance, Epidemiology, and End Results), у США захворюваність на НЕН на 1 січня 2004 р. становила 5,25 випадків на 100 тис. населення. Отже, з урахуванням чисельності населення США, у нашій країні щороку мають реєструвати 2163 пацієнтів з НЕН (населення України станом на 1 грудня 2021 р. — 41 млн. 208 тис. осіб).

Високо диференційовані НЕН (ТС і АС) у США і країнах Європи тривалий час вважали орфанними захворюваннями, частота їх виявлення не перевищувала 0,2–2 випадки на 100 тис. населення на рік, але впродовж останніх 30 років частота виявлення цих пухлин щороку зростає майже на 6%. За даними літератури, в структурі НЕН бронхо-легеневої локалізації на ТС

припадає 9–12,4% спостережень, на АС — 1–3,6%, на LCNEC — 9,8–15%, на SCLC — 66,5–75%. У структурі всіх злоякісних новоутворень легень ТС складає близько 1% випадків, АС — 0,1%, LCNEC — 4,8%, SCLC — 13,9% відповідно [30, 34, 95, 129, 137, 182, 196]. Частота виявлення НЕН легень на 100 тис. населення: ТС — близько 0,77, АС — 0,22, LCNEC — 0,41, SCLC — 8,93 [52, 197].

ТС частіше виявляють в осіб молодого віку, переважно у жінок, виникнення цього варіанту НЕН не пов'язане з палінням. АС переважно виявляють у чоловіків віком 50–59 років, при цьому відзначається зв'язок з палінням [10]. LCNEC переважають у віковій групі 60–69 років, SCLC — у пацієнтів старше 70 років, при НЕК співвідношення чоловіки / жінки >2,5:1, відзначається чіткий зв'язок з палінням [63].

### **1.3.1. Проблематика нейроендокринних новоутворень легень під час епідемії Covid-19**

Хоча на сьогоднішній день епідемія Covid-19 майже вщухла, нюанси її перебігу та наслідки не втрачають своєї актуальності. Пацієнти з НЕН легень є вразливою категорією, навіть якщо коронавірусна хвороба у них має легкий або середньо тяжкий перебіг. За м'якого перебігу захворювання, на думку більшості авторів, певна затримка у рутинному спостереженні або лікуванні не є проблемою. Але за наявності загрозливих для життя симптомів, пов'язаних з Covid-19, пацієнти потребують термінового лікування, а тривала протипухлинна терапія тимчасово може бути відтермінована. У будь-якому випадку потрібно знайти розумний компроміс з урахуванням тяжкості коронавірусної хвороби, а також ступеня злоякісності, стадії НЕН бронхо-легеневої локалізації та етапу лікування пацієнта [26, 109].

В літературі описані випадки помилкового встановлення діагнозу Covid-19 (за клінічними ознаками) у пацієнтів при НЕН бронхо-легеневої локалізації, зокрема, при ТС. Більшість ТС розташовані центрально і можуть спричиняти клінічні ознаки бронхіальної обструкції з повторними епізодами пневмонії, задишки, кровохаркання, хрипами, болем у грудях. В еру пандемії коронавірусу пацієнти з раком легень наражаються на високу небезпеку інфікування Covid-19, своєчасне виявлення патології та диференційна діагностика суттєво утруднені через відсутність комплексної оцінки та значну подібність цих захворювань як за клінічними проявами, так і за даними МРТ. І хоча більшість випадків лімфаденопатії спричинені реактивними імунними реакціями, ураження внутрішньогрудних та медіастінальних лімфатичних вузлів свідчить на користь метастазування НЕН бронхо-легеневої локалізації [133].

В цілому ж, під час епідемії Covid-19 у системі охорони здоров'я багатьох країн відбулися певні зміни, що негативно позначилися на виявленні, діагностиці та лікуванні онкологічних захворювань. Зокрема, ситуація щодо НЕН легень за даними звіту Italian Association for Neuroendocrine Tumors (мультицентричне дослідження): зменшилася кількість вперше діагностованих випадків НЕН (на 76,8%); зменшилася кількість оперативних втручань з приводу НЕН (на 58%); затримка у проведенні радіонуклідної терапії відзначена у 45,5% випадків; діагностичні заходи переносили в часі або взагалі не проводили (26%); мультидисциплінарний підхід не використовувався при НЕН (у 20,8% хворих); у 10% медичних центрів через пандемію змушені були відмовитися від системного медикаментозного лікування пацієнтів при НЕН [150].

За даними попередніх статистичних досліджень, рівень смертності онкохворих під час епідемії Covid-19 значно перевищив такий у доковідну еру. Зокрема, йдеться про пацієнтів зі злоякісними новоутвореннями грудної клітки, які є більш вразливими до коронавірусу з огляду на їх зазвичай

похилий вік, тривалий стаж тютюнопаління, часто — наявність серцево-легеневої патології. За даними мультицентричного дослідження, рівень смертності таких хворих надзвичайно високий і, на жаль, навіть в країнах Західної Європи не завжди є можливість госпіталізувати їх у відділення інтенсивної терапії (останні показник виявився несподівано низьким) [68]. Хоча за даними іншого дослідження, яке тривало у 8 закладах впродовж року (червень 2020 – березень 2021) — внаслідок Covid-19 померли лише 7,8% пацієнтів з НЕН легень, які перебували під наглядом авторів, понад 80% — одужали, як зазначили автори «без серйозних наслідків для здоров'я» [61]. Незважаючи на те, що зазначене дослідження було мультицентровим, вибірка залишалася невеликою (до 200 пацієнтів); отримані результати вкотре виявилися неоднозначними при спробі їх порівняння через гетерогенність НЕН бронхо-легеневої локалізації, різне співвідношення їх морфологічних підтипів, що має суттєвий вплив на клінічний перебіг, виживаність і прогноз.

#### **1.4. Особливості метастатичного ураження при нейроендокринних пухлинах легень**

НЕН бронхолегеневої локалізації — досить гетерогенні новоутворення, які за гістологічними особливостями, рівнем проліферативної активності та клінічною поведінкою розподіляють на основні 4 підтипи: високо та помірно диференційовані НЕП (ТС і АС), і низько диференційовані НЕК (LCNEC і SCLC) [130, 148, 165]. Проте, такий поділ не є остаточним, оскільки іноді добре диференційовані НЕН за своїм перебігом більше подібні до агресивних [106, 148, 167]. Всі НЕП вважають потенційно злоякісними та здатними до метастазування [92, 97].

Зазвичай НЕП бронхолегеневої локалізації характеризуються асимптомним перебігом (90% з них є секреторно неактивними) або неспецифічними клінічними проявами, подібними до таких при ХНЗЛ, що



суттєво утруднює та відтерміновує їх діагностику. Незважаючи на досягнення сучасної медицини, у більшості випадків НЕН легень виявляють на III–IV стадії, що асоціюється з поганою виживаністю (в середньому 16 міс.) [84].

Після радикальної резекції карциноідів бронхо-легеневої локалізації можуть бути отримані хороші віддалені результати. Однак, за різними даними, у 5–70% хворих при ТС і АС легень через кілька років і навіть десятиліть після операції виявляють метастази, зазвичай у регіонарних лімфатичних вузлах, рідше віддалені (в печінці, кістках, м'яких тканинах, і т.д.). За даними літератури, для ТС 5-річна виживаність становить майже 90%, для АС — 50%, для LCNEC — від 15 до 57%, для SCLC — менше 5%. При ТС метастази в регіонарних лімфатичних вузлах виявляють у 10–15% спостережень, віддалені (частіше за все у печінці та кістках) — у 3–5% хворих. При АС метастази у регіонарні лімфатичні вузли наявні у 60% випадків, віддалені — майже у 20%. За наявності метастазів 5-річна виживаність пацієнтів при карциноїдах суттєво зменшується — до 15–25% [25, 70, 83, 97, 117, 128, 160, 179, 196, 239].

LCNEC і SCLC притаманні подібні гістопатологічні характеристики. Це низько диференційовані, високо агресивні НЕК з поганим прогнозом, підвищеною тенденцією до метастазування; зазвичай їх діагностують на пізніх стадіях [98, 104]. За даними літератури, ризик ураження структур ЦНС при LCNEC сягає 50%. Тривалість життя таких хворих зрідка перевищує декілька місяців [34]. SCLC — найбільш агресивний варіант НЕН легень, у більшості пацієнтів на момент встановлення діагнозу наявна метастатична хвороба; додавання до хіміотерапії першої лінії блокаторів імунних контрольних точок несуттєво збільшує медіану виживаності. Прогноз вкрай невтішний: 5-річна виживаність становить 15–30% при виявленні SCLC на I–II стадії і менше 1% — на поширеній стадії [30].

За даними літератури, при НЕН легень найчастіше метастази виявляють у середостінні та периферичних лімфатичних вузлах (понад 40% спостережень), печінці (19–25%), кістках (10–15%), головному мозку (9%), що

суттєво погіршує прогноз [42, 86, 151, 177, 251]. При НЕН іншої первинної локалізації (ШКТ, підшлункова залоза) так само часто уражуються печінка і кістки, проте, метастази у структурах ЦНС виявляють вкрай рідко (близько 0,3% випадків). Метастатичне ураження головного мозку властиве саме НЕК легень. Деякі автори наголошують на необхідності МРТ / КТ-скринінгу з метою виявлення асимптомних метастазів (які при SCLC відзначаються найчастіше). Ймовірність метастатичного ураження головного мозку за наявності метастазів на момент встановлення діагнозу НЕК легень сягає 51,4%, і 35,7% — за їх відсутності [86]. Метастатичний патерн при НЕН різної локалізації наведений на рис. 1.4.1; частота ураження структур ЦНС при НЕК легень — на рис. 1.4.2.

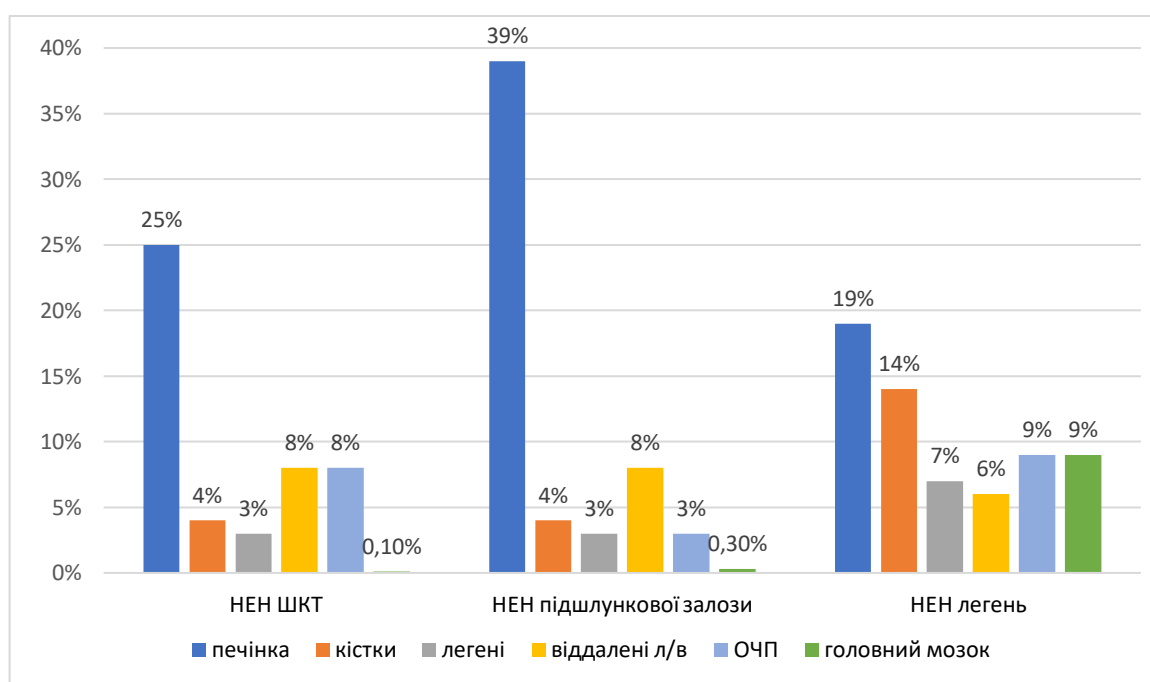


Рис. 1.4.1. Метастатичний патерн при НЕН різної первинної локалізації за даними Netherlands Cancer Registry (2008–2018). Загальна кількість пацієнтів з НЕН ШКТ — 4710, з НЕН підшлункової залози — 1150, з НЕН бронхолегеневої локалізації — 2978 (за Hermans В.С.М., et al., 2021) [86].

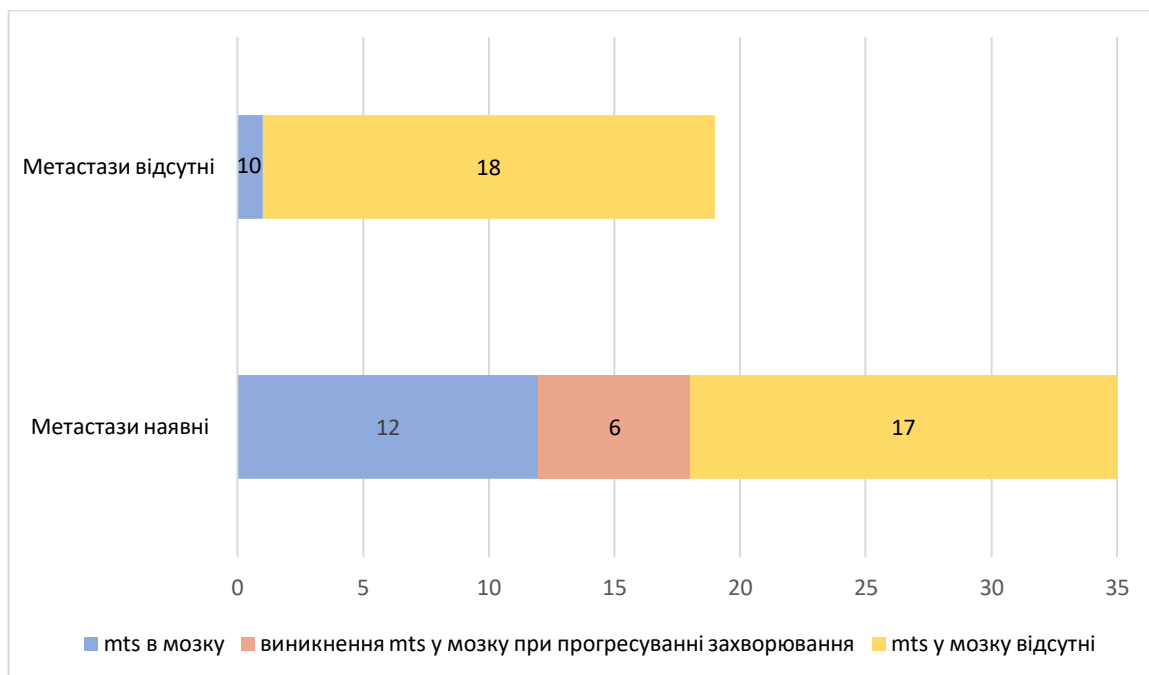


Рис. 1.4.2. Кумулятивна частота виявлення метастазів у головному мозку на прикладі LCNEC у пацієнтів з метастатичною хворобою на момент встановлення діагнозу та без такої (за Hermans В.С.М., et al., 2021) [8].

#### 1.4.1. «Анонімні» метастази та метастази рідкісних локалізацій при нейроендокринних пухлинах легень

Згідно світових епідеміологічних даних, НЕН виявляють у 6,98 осіб на 100 тис. населення, а НЕН невизначеної первинної локалізації — в 0,84 випадках на 100 тис. населення. На практиці у понад 20% випадків первинна локалізація НЕН не відома або не зазначена у медичній документації [13]. НЕН невизначеної первинної локалізації (близько 11–22% всіх НЕН і до 5% у структурі всіх злоякісних пухлин невизначеної первинної локалізації) майже у 90% випадків представлені низько диференційованими формами; це «запущені» клінічні випадки, з поганим прогнозом, для яких не вдається встановити тканинне походження за допомогою стандартного морфологічного дослідження. Як правило, виявляють такі НЕН за віддаленими «анонімними» метастазами. Визначення первинної локалізації новоутворення має критичне значення для встановлення ступеня злоякісності пухлини та її органо-

специфічного стадіювання, вибору відповідного лікування та визначення прогнозу. Використання діагностичного алгоритму, який поєднує в собі гістологічне, ІГХ-дослідження, методи візуалізації та за можливості — інші сучасні технології сприяє суттєвому зменшенню кількості випадків НЕН з невизначеною первинною локалізацією [2, 13, 110, 191], рис. 1.4.1.1.

У рутинній роботі патолога підтвердження діагнозу НЕН за наявності у хворого «анонімних» метастазів ґрунтоване на результатах комплексного гістологічного (з урахуванням морфології клітин пухлини) та ІГХ-дослідження (ChrA, Syn, CD56). У випадку високо диференційованих НЕН експресія TTF-1 свідчить на користь первинної бронхо-легеневої локалізації новоутворення, її відзначають у 43% таких пухлин. CK7 допомагає провести диференційну діагностику між НЕН ШКТ і легень (для первинних пухлин ШКТ експресія CK7 нехарактерна) [62].

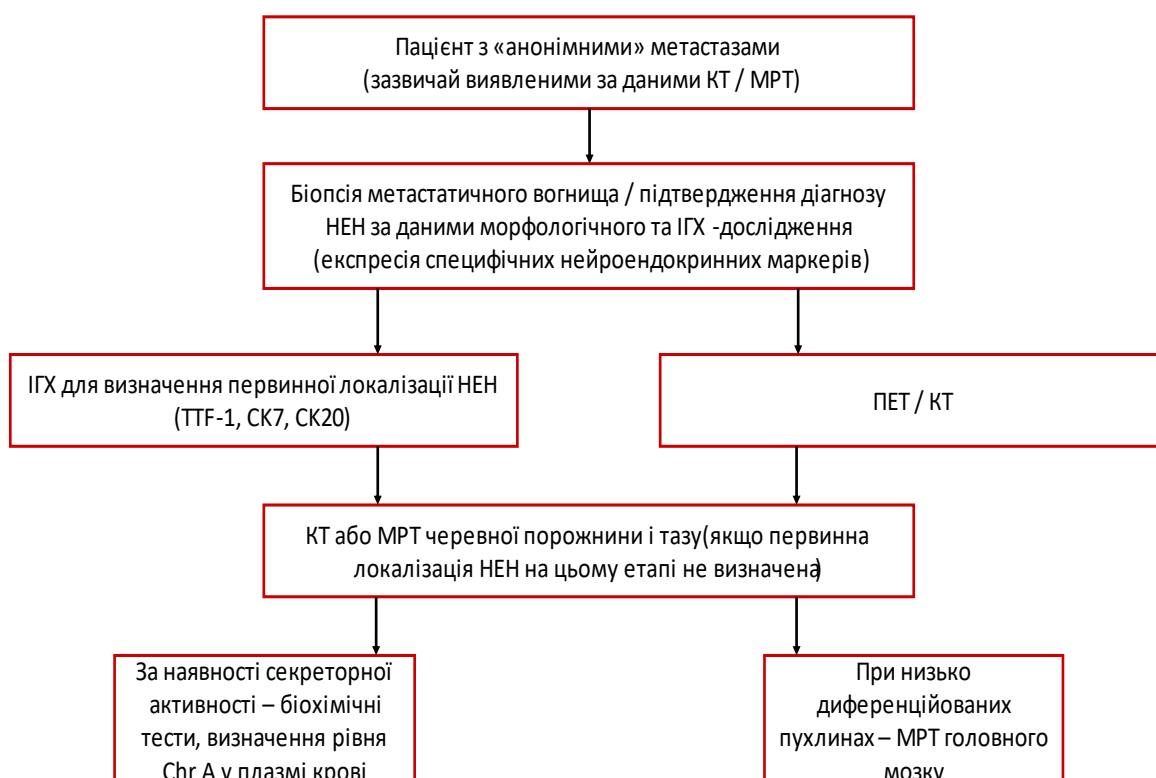


Рис. 1.4.1.1. Рекомендований діагностичний алгоритм у випадку НЕН невизначеної первинної локалізації (адаптовано за Berner A.M., et al., 2020 [13]).

Первинні НЕН підшлункової залози — добре вивчена патологія, а от її метастатичне ураження при НЕП інших локалізацій трапляється вкрай рідко, однак в літературі описані кілька подібних випадків при карциноїдних пухлинах легень [203].

Також досить рідкісним в клінічній практиці є метастатичне ураження спинного мозку, зокрема при карциномах невизначеної первинної локалізації. І хоча метастатичне ураження структур ЦНС характерне саме для НЕН бронхо-легеневої локалізації, випадки ураження саме спинного мозку є унікальними — у літературі описані спостереження метастазів у грудному відділі спинного мозку при НЕН легень [74].

Метастази в гіпофізі — рідкісний випадок у клінічній практиці, зазвичай їх виявляють при раку молочної залози у жінок і раку легень у чоловіків. Нерідко клінічні симптоми неспецифічні або взагалі відсутні, а при пухлинах без визначеної первинної локалізації пацієнтам встановлюють діагноз первинної аденоми гіпофіза [121].

Як уже зазначалося, зазвичай злоякісні новоутворення легень метастазують у структури грудної клітки, печінку, кістки, головний мозок, надниркові залози. На 6-му за частотою місці — метастатичне ураження судинної оболонки ока [32, 143, 223]. У нашому дослідженні було одне таке цікаве спостереження. Метастази НЕН у структурах очниці та ока також є дуже рідкісними клінічними спостереженнями. Так, за даними літератури, у мережі Pubmed у період з 1966 по 2019 рр. опубліковано 21 роботу, в яких йшлося про 64 випадки метастазування НЕН різної первинної локалізації у структури ока, у більшості випадків — 39 (46,8%) відзначалося ураження його судинної оболонки, ймовірно, завдяки її багатій васкуляризації. Примітно, що переважна більшість метастатичних НЕН мала первинну бронхо-легеневу локалізацію — 28 (43,7% спостережень) [111].

Структури ока — рідкісна локація для метастазування злоякісних новоутворень (1–5% випадків за їх системного поширення), до того ж подібні

ураження суттєво погіршують якість і скорочують тривалість життя пацієнтів, яка, за даними різних літературних джерел, зазвичай не перевищує 13–22 міс, а подекуди і 4–6 міс, незважаючи на гістологічний тип первинного злоякісного новоутворення [113, 136, 187].

За даними ретроспективних досліджень, у 24–34% пацієнтів орбітальні метастази були першим клінічним проявом злоякісного новоутворення з дисемінацією. Майже у 90% випадків метастатичне ураження структур орбіти є одnobічним, частіше зліва [3, 54, 66, 120, 200, 223]. За метастатичного ураження структур ока найчастіше страждає його судинна оболонка (майже 80% спостережень), дещо рідше вражаються райдужна оболонка (10%) та цилиарне тіло (2%). Найчастіше хороїдальні метастази виявляють при раку молочної залози (близько 55% випадків), злоякісних новоутвореннях легень (16–20%), меланомі шкіри (4,5%), пухлинах передміхурової залози (3,6%) та шлунково-кишкового тракту (3,6%). У пацієнтів дитячого віку в структурі ока здебільшого метастазує нейробластома [54, 136]. За даними літератури, 0,7–12% хворих на рак легень мають орбітальні метастази за рахунок гематогенної пухлинної дисемінації [3]. Хороїдальна оболонка кровопостачається з досить крупної судини — *a. ciliary posterior*, до того ж хороїдальні судини мають численні анастомози, що сприяє гематогенному поширенню метастазів. За наявності хороїдальних метастазів ймовірність того, що у хворого наявні множинні метастази у інших органах, суттєво зростає [32, 223].

### **1.5. Морфологічна характеристика різних гістологічних підтипів нейроендокринних новоутворень бронхолегеневої локалізації**

Бронхоскопія є методом вибору для проведення передопераційної гістологічної діагностики. Однак її виконання може бути обмежене певними особливостями бронхіальних НЕН, в основному, їх інтенсивною

васкуляризацією, що спричиняє більшість кровотеч під час бронхоскопічної біопсії, а в поодиноких випадках потребує негайної торакотомії. Зразки матеріалу, отриманого шляхом такої біопсії є досить дрібними, нерідко з crush-артефактами і масивними крововиливами.

НЕН бронхо-легеневої локалізації відносять до єдиної групи новоутворень, їм притаманні спільні гістологічні та ПХ-ознаки нейроендокринного диференціювання. Разом з тим, дані молекулярно-генетичних досліджень свідчать про те, що карциноїди суттєво відрізняються від групи високо зляжисних НЕН (LCNEC і SCLC) [46].

Морфологія є наріжним каменем диференційної діагностики між карциноїдами і НЕК, а морфологічні критерії в поєднанні з індексом проліферації Ki-67 покращують її точність, що має неабияке клінічне значення [110].

Карциноїди складають до 2% в структурі новоутворень легень. Їм притаманна добре організована органоїдна морфологія («гнізда», «розетки», «палісади», структури у вигляді ланцюжків і стрічок, що анастомозують, складені з однотипних клітин з еозинофільною цитоплазмою та дрібнозернистим ядерним хроматином. У карциноїдах може бути виявлений певний ядерний плеоморфізм і різні зміни пухлинних клітин (веретенноклітинні, папілярні, муцинозні та інші варіанти гістологічної будови). Однак особливості росту та гістологічної будови, ядерний поліморфізм, місцева судинна інвазія і навіть регіонарні метастази не є критеріями для чіткого розмежування ТС і АС, на відміну від індексу проліферації та наявності вогнищ некрозу.

ТС — рідкісні НЕН, за даними літератури, на них припадає близько 1% у структурі первинних пухлин легень і до 80% — у структурі усіх карциноїдних пухлин бронхо-легеневої локалізації. Для ТС характерна центральна локалізація (85% випадків) і відносно молодий вік хворих (у середньому 45–55 років), інколи їх виявляють навіть у дітей [192, 243]. ТС

безпосередньо не пов'язаний з тютюнопалінням. Зазвичай такі пухлини ростуть повільно, асоційовані з обструкцією, інфекціями, крововиливами; периферичні форми безсимптомні. Карциноїдний синдром виявляють вкрай рідко (<2% спостережень). Майже у 70% випадків захворювання виявляють на ранній стадії, прогноз вважається хорошим (5-річна загальна виживаність 82–100%). Однак, у 5–10% (за даними деяких авторів — у 23%) спостережень при ТК виявляють метастази у регіонарних лімфатичних вузлах [46, 88, 148, 178, 180].

Діагностичні ознаки ТС — це поєднання високодиференціованої нейроендокринної морфології та низької проліферативної активності (<2 мітозів на 2 мм<sup>2</sup>, Ki-67 до 5%); вогнища некрозу в тканині пухлини відсутні. За даними ІГХ-дослідження у переважній більшості клітин ТС виявляють дифузну та інтенсивну експресію нейроендокринних маркерів (ChrA і Syn). Більшість зразків ТС TTF-1 позитивні.

АС — не перевищує 20% у групі карциноїдних пухлин легень. АС зазвичай виявляють у молодій віковій групі (вік хворих у середньому — 50 років) в на досить ранніх стадіях захворювання, як правило, у периферичних відділах легень. Зв'язок з тютюнопалінням спостерігається частіше, ніж при ТС. Прогноз при АС набагато менш сприятливий, ніж при ТС (5-річна виживаність становить 25–80%). У 40–50% спостережень при АС у регіонарних лімфатичних вузлах виявляють метастази [90, 100].

Діагностичні критерії АС: морфологічні прояви нейроендокринного диференціювання та помірно виражена проліферативна активність (2–10 мітозів на 2 мм<sup>2</sup>, Ki-67 до 30%). Оцінка експресії Ki-67 дуже важлива при аналізі малих і crushed біопсій з метою уникнення гіпердіагностики НЕН високого ступеня злоякісності. Проте, поріг індексу Ki-67 для АС неодноразово змінювався, що спричиняє труднощі у градації НЕН бронхо-легеневої локалізації та у спробах порівняти результати різних досліджень [71]. Ще один значущий діагностичний критерій — наявність фокальних або



точкових / пунктирних вогнищ некрозу, які складають до 10% площі зразка пухлини. В АС виявляють виражену експресію нейроендокринних маркерів (ChrA і Syn), проте імунореактивність у деяких випадках може бути нерівномірною або фокальною. У майже 30% АС відсутня експресія цитокератинів, близько 50% — TTF-1-негативні. Оскільки мітози і некрози інколи наявні у тканині АС лише фокально, малі біопсії можуть бути нерепрезентативними, за ними складно відрізнити ТС і АС. Наразі, було запропоноване використання додаткового критерію для більш об'єктивної оцінки проліферативної активності — мітозоспецифічного ІГХ-маркера фосфогістон Н3 (РНН3), однак досвід його використання досить обмежений [93, 190, 228].

Для низько диференційованих НЕН легень притаманна солідна модель росту, великі за площею / географічні некрози, висока проліферативна активність і досить неоднорідне забарвлення на нейроендокринні маркери.

Вогнища некрозу в тканині пухлини вважають наслідком хронічної клітинної гіпоксії. Обидва ці фактори (гіпоксія та некроз) у деяких пухлинах корелюють з поганим прогнозом. Великі вогнища некрозу свідчать на користь агресивного фенотипу новоутворення, проте, його прогностичне значення у більшості випадків залишається невизначеним [207]. Для крупно- і дрібноклітинних нейроендокринних карцином легень вогнища некрозу є характерним гістопатологічним патерном. І згідно результатів нещодавніх досліджень, велика частка некрозу в тканині пухлини ( $\geq 10\%$  площі) є негативним прогностичним чинником у випадку низько диференційованих НЕП легень [205].

Клітинні характеристики використовуються для диференційної діагностики LCNEC і SCLC, хоча, через певний «перехрест» морфологічних критеріїв розмежування між цими двома категоріями є досить складним і певною мірою суб'єктивним, особливо у випадку малих біопсій. Те саме стосується і високих показників проліферативного індексу, вони притаманні

НЕК легень, різним за своїми морфологічними, біологічними та клінічними характеристиками [110, 247].

LCNEC — дуже агресивний варіант НЕН бронхо-легеневої локалізації, тісно пов'язаний з палінням, який складає від 0,3–3% у структурі всіх новоутворень легень. Зазвичай LCNEC мають периферичну локалізацію; часто асоційовані з тютюнопалінням. Загальна 5-річна виживаність близько 30% [8, 163, 240].

LCNEC може бути представлений як солідними ділянками, так і органоїдними комплексами з формуванням характерних «палісадів», «розеток» і трабекулярних структур. Клітини пухлини досить крупного розміру (порівняно з SCLC), полігональної форми, з великою кількістю цитоплазми. В ядрах виявляють грубий або везикулярний хроматин і добре виражені ядерця. Крім клітинних характеристик, які в основному відповідають недрібноклітинному раку легень, діагностичні ознаки LCNEC включають високу мітотичну активність ( $>10$  мітозів на  $2 \text{ мм}^2$ , у середньому 50–70 мітозів на  $2 \text{ мм}^2$ ), Ki-67  $>30\%$  (зазвичай  $>40\%$ ), а також великі протяжні некрози [8, 48, 132].

Гістологічна діагностика LCNEC на матеріалі малих біопсій може бути утруднена, оскільки складно оцінити характерну нейроендокринну морфологію у мізерних зразках тканини.

При ІГХ-дослідженні LCNEC, яка є обов'язковою складовою діагностики даного типу НЕН легень, необхідно виявити експресію хоча б одного нейроендокринного маркера не менш ніж у 10% пухлинних клітин. У багатьох випадках ІГХ-дослідження покликане підтвердити одночасно епітеліальну та нейроендокринну природу новоутворення.

На підставі сучасних генетичних досліджень виділені декілька молекулярних підтипів цієї складної та недостатньо вивченої категорії нейроендокринних карцином легень (зокрема, SCLC-like, NSCLC-like і

carcinoid-like). Не виключено, що морфологічна різноманітність ускладнює підходи до лікування LCNEC [7].

Диференційна діагностика LCNEC має проводитися з крупноклітинним раком, SCLC, АС. Але за невисокого мітотичного індексу та аденокарциномою, плоскоклітинним раком (базалоїдний варіант), подібних до карциноїдів морфологічних рис LCNEC потрапляють у «сіру зону» морфологічної класифікації [194].

Комбіновані LCNEC містять додатковий компонент (не менше 30% в структурі НЕН), представлений будь-яким типом недрібноклітинного раку легень, зазвичай аденокарциномою або плоскоклітинною карциномою [46, 84]. Однаково для таких пухлин характерний агресивний перебіг і поганий прогноз, а коректний діагноз спірний і відтермінований [115]. Хоча деякі автори відносять «комбіновані» НЕН або до вкрай рідкісних спостережень [172, 186], або навіть до некоректних діагнозів [130], у будь-якому випадку ця ситуація потребує подальшого вивчення.

Найчастіше в клінічній практиці зустрічається SCLC, 15–20% всіх видів раку легень; у США діагностують понад 30 тис. нових випадків захворювання на рік. Це найбільш поширена (75% в структурі бронхогенних НЕН) і вкрай агресивна форма НЕН бронхо-легеневої локалізації. SCLC зазвичай росте центрально, уражує крупні бронхи, майже в усіх випадках є зв'язок з інтенсивним і тривалим тютюнопалінням. Високий ступінь злоякісності пухлини визначає її надзвичайно агресивний клінічний перебіг, раннє та поширене метастазування та несприятливий прогноз з найгіршими показниками 5-річної виживаності серед усіх гістологічних варіантів новоутворень легень. Щонайменше у 70% хворих на момент встановлення діагнозу наявні численні метастази у бронхолегеневих і медіастінальних лімфатичних вузлах, а 2/3 пацієнтів виявляють віддалені метастази у печінці, головному мозку, кістках, наднирниках тощо. 5-річна виживаність 2–10% [9,

46, 84, 127]. Лише у третині випадків діагноз встановлюють на непоширеній стадії [182].

Діагностичні ознаки SCLC включають дифузний ріст у вигляді широких тяжів і пучків клітин, які часто орієнтовані в одному напрямку, але можуть бути наявні і «розетки», «палісади», «гнізда». Інколи SCLC за типом росту може нагадувати злоякісну лімфому, особливо у випадку ураження жирової клітковини середостіння. Для SCLC характерні поширені некрози та висока мітотична активність ( $>10$  мітозів на  $2 \text{ мм}^2$ , у середньому 80 фігур мітозу на  $2 \text{ мм}^2$ ), рівень експресії Ki-67 70–90%. Також виявляють велику кількість апоптотичних тілець. У ділянках некрозу часто спостерігається т.зв. «ефект Азопарді» — базофільна інкрустація стінок судин ДНК зі зруйнованих клітин пухлини [176, 238].

SCLC складається з дрібних (діаметр не перевищує такий 3-х малих лімфоцитів у спокої) однотипних клітин округлої або витягнутої форми з мізерною цитоплазмою та нечіткими клітинними межами. Дрібнозернистий ядерний хроматин нагадує «матове скло», ядерця непомітні. Про крихку структуру ядер свідчать податливість та їх видовжені форми, налипання та відбитки поверхні (nuclear moulding), роздавлювання (crush-artefact). Характерна висока мітотична активність, велика кількість каріопікнозів, апоптотичних тілець. Зони дифузного росту SCLC можуть поєднуватися з типовими карциноїдними структурами [95, 240].

Виділяють т.зв. «чистий» варіант SCLC і змішаний — коли щонайменше 10% площі пухлини представлені структурами, які морфологічно кваліфікуються як недрібноклітинний рак (комбінація SCLC з крупноклітинною карциномою, плоскоклітинною, аденокарциномою тощо). Деякі автори зазначають, що комбіновані варіанти SCLC зустрічаються з частотою 3–28% [141], у той час як інші — ставлять під сумнів наявність таких НЕН / відносять подібні випадки на рахунок некоректної діагностики або принаймні наголошують на їх невеликій частоті [130, 186].

Як уже зазначалося, чинна класифікація НЕП бронхо-легеневої локалізації має власні переваги та недоліки [110]. Диференціальна діагностика підтипів НЕП легень базується на 2 параметрах: наявності / відсутності некрозів та кількості мітозів на 2 мм<sup>2</sup>. Діагноз «типовий карциноїд» встановлюють за відсутності в тканині пухлини вогнищ некрозу, при цьому кількість мітозів <2 на 2 мм<sup>2</sup>; в атиповому карциноїді наявні вогнища некрозу, кількість мітозів — від 2 до 10 на 2 мм<sup>2</sup>; у високо злоякісних низько диференційованих карциномах (LCNEC і SCLC) >10 мітозів на 2 мм<sup>2</sup>, зазвичай наявні великі вогнища некрозу. Фокальні некрози, як правило, не перевищують 20% площі зразка, великі — можуть перевищувати 50% площі зразка [64].

Некрози в тканині пухлини є наслідком хронічної клітинної гіпоксії. Обидва ці фактори (гіпоксія та некрози) в деяких пухлинах корелюють з поганим прогнозом. Великі некрози свідчать про агресивний фенотип новоутворення, однак, прогностична цінність цього явища у більшості випадків нез'ясована [207]. Некрози часто виявляють у LCNEC і SCLC. Згідно даних останніх досліджень, великий % некрозу ( $\geq 10\%$ ) є негативним прогностичним чинником у НЕП легень високого ступеня злоякісності [205].

Також оцінюють морфологічні та архітектурні особливості, застосовують в діагностиці маркери ПГХ. Але певні морфологічні особливості та експресія ПГХ-маркерів не завжди наявні у невеликих біопсіях та подрібнених зразках [178, 205].

Класифікація ВООЗ НЕП травної системи оновлена у 2019 р., в той же час для НЕП бронхо-легеневої локалізації, через численні розбіжності та суперечливі результати досліджень, ще впродовж 3 років використовується класифікація 2015 р. Недосконала діагностика може спричинити пізніше встановлення діагнозу та невтішний прогноз. Крім того, більшість НЕП легень (понад 95%) є нефункціональними, їх зазвичай виявляють випадково або у зв'язку з виникненням метастатичного ураження [9, 148]. Понад 20% НЕП

легень маніфестують метастазами, переважно в печінку і/або кістки. Середня тривалість життя хворих при НЕП легень IV стадії становить 17 міс і менше [12, 177].

За такої ситуації пошук надійних прогностичних факторів для оцінки поведінки НЕП легень є дуже важливим. І ймовірно, що більшість з них пов'язані з проліферацією клітин пухлини [159, 170]. Цей показник є дуже важливим інструментом оцінки біологічних характеристик новоутворення. Високий проліферативний індекс свідчить про швидкий ріст або агресивність новоутворення. Однак, незважаючи на велику кількість публікацій, оцінка проліферації недостатньо впроваджена у повсякденну практику [35]. Кінетика проліферації клітин залежить від типу / підтипу новоутворення, тривалості клітинного циклу, частки клітин, що проліферують тощо [173]. Використання різних методів для оцінки проліферації також сприяє певній плутанині. Однак, дослідники не полишають спроб оцінити проліферативний потенціал злоякісних клітин, деяким з них вдалося показати достовірну прогностичну цінність мітотичного індексу (МІ), а також ІГХ-маркерів проліферації (зокрема, Ki-67, PNH3 та ін.) [82, 99, 149, 228].

МІ вважають одним з основних факторів визначення ступеня злоякісності різних новоутворень [134, 217]. Однак він має певні обмеження через гетерогенність самих пухлин та використання різних методів підрахунку. Також апоптотичні тільця або зруйновані клітини можуть бути помилково сприйняті за К-мітози, що позначається на результатах дослідження [29, 56]. Крім того, результати підрахунку мітозів є досить суб'єктивними, саме дослідження вимагає багато часу [112].

Ki-67 може бути потужним інструментом для простого та швидкого виявлення проліферуючих клітин у тканині пухлини [12]. Ki-67 (індекс проліферації) широко використовують у повсякденних патоморфологічних дослідженнях. Його вважають «золотим стандартом» ІГХ та використовується для оцінки агресивності пухлини [55, 71, 130]. І хоча Ki-67 глибоко

досліджували при різних злоякісних пухлинах, широко клінічного визнання він так і не набув. Існує думка, що Ki-67 не має достовірної діагностичної цінності у НЕП легень, оскільки рівні експресії цього маркера суттєво «перекриваються» у різних підтипах пухлин [130, 157].

Рівень проліферації клітин пухлини, визначений за допомогою мітотичного індексу на зрізах, забарвлених гематоксилином і еозином або за допомогою проліферативного індексу Ki-67 при ІГХ-дослідженні, характеризує поділ клітин новоутворення. Але ці параметри характеризують різні фази клітинного циклу, до того ж, бракує стандартизованої методології, існують розбіжності в результатах при оцінці різними дослідниками. Незважаючи на всі ці недоліки, численні дослідження показали хорошу кореляцію між Ki-67 та МІ у багатьох новоутвореннях [102, 235]. Крім того, за даними деяких досліджень, МІ може бути використаний в якості прогностичного чинника, наприклад, у бронхо-легеневих НЕП, асоційованих з метастатичним ураженням [82, 99, 134].

Методом вибору при лікування карциноїдів бронхолегеневої локалізації є хірургічний, в основу якого покладені три принципи: 1) повне видалення пухлини у межах здорових тканини; 2) максимальне збереження неураженої паренхіми легень; 3) іпсилатеральна медіастінальна лімфаденектомія. Останній пункт зумовлений високою частотою виявлення у хворих на НЕП легень лімфогенних метастазів, які виявляють навіть при типовому карциноїді. Після радикального видалення метастазування типового карциноїду спостерігають рідко (близько 7% випадків), 5-річна виживаність становить близько 90%, а причиною смерті хворих зазвичай є інтеркурентні захворювання. 5-річна виживаність за наявності атипичного карциноїду зазвичай не перевищує 61–73%; у випадку LCNEC і SCLC показники далекі від оптимістичних — 13% і 5% відповідно, при SCLC відзначені лише поодинокі випадки 2-річної виживаності пацієнтів [215, 249]. В цілому 5-річна

виживаність пацієнтів складає 54,5%, але за наявності ураження лімфатичних вузлів не перевищує 20% [197].

Хірургічне лікування високо злоякісних НЕН має включати анатомічну резекцію та радикальну лімфаденектомію. Як правило, НЕН бронхо-легеневої локалізації нечутливі до радіаційної терапії. При рецидивуючих або метастазуючих НЕН легень зазвичай застосовують різні цитотоксичні препарати (доксорубіцин, цисплатин, карбоплатин тощо), проте, ефективність цих лікарських засобів залишається досить низькою, клінічна відповідь наявна лише у 30% спостережень. Останнім часом з'явилися нові препарати для лікування хворих при неоперабельних НЕН: інгібітори тирозинкінази (еверолімус, сорафеніб, сунітініб), а антитіла до фактору росту ендотелію судин (бевацизумаб), однак і їх ефективність поки що залишається невисокою [168, 209, 242].

### **1.6. Імуногістохімічні маркери в діагностиці та визначенні прогнозу при нейроендокринних пухлинах легень**

На момент встановлення діагнозу у більшості хворих на НЕН легень симптоми відсутні або наявні декілька неспецифічних, слабо виражених ознак захворювання, які у понад 60% випадків імітують хронічну патологію органів дихання (астму або інші хронічні обструктивні захворювання легень), що суттєво ускладнює та відтерміновує коректу діагностику. Понад 95% НЕН легень є нефункціональними, отже, не супроводжуються гормональними розладами; нерідко їх виявляють випадково, через спричинений пухлиною мас-ефект або за метастатичним ураженням [9, 84].

Переважає більшість високо і помірно диференційованих НЕН поводяться як пухлини з низьким ступенем злоякісності. Однак злоякісний потенціал притаманний всім НЕН легень. Навіть ТС, який метастазує майже у



10% спостережень; при АС ризик віддаленого метастазування оцінюється у 20%, проте, він набагато вищий при LCNEC — майже 50% і SCLC — 70% [129, 178].

Ключові моменти коректної діагностики бронхо-легеневих НЕН: характерний органоїдний паттерн росту («розетки», трабекули, стрічки, «гнізда», палісади); рівень мітотичної активності, характеристика вогнищ некрозу, які відіграють важливу роль у визначенні Grade НЕН легень та прогнозу [94, 159, 205] (див. рис. 1).

Однак, всі морфологічні характеристики НЕП і НЕК «перекриваються», верифікація діагнозу НЕН легень потребує використання ІГХ. Крім того, деякі низько диференційовані НЕН легень неможливо діагностувати за результатами рутинного гістологічного дослідження (гематоксилін та еозин), зокрема, це стосується малих і “crushed” біопсій, які також потребують ІГХ. Також біомаркери допомагають виключити гістологічну «мімікрію» (низько диференційовану плоскоклітинну карциному, гематологічні захворювання тощо), особливо у випадку НЕК. ІГХ використовують для оцінки агресивності НЕН легень шляхом визначення індексу проліферації (Ki-67), а також виявлення експресії маркерів нейроендокринного диференціювання (крім NSE; найкращим варіантом вважається панель ChrA, Syn, SD56) та визначення первинної локалізації новоутворення (TTF-1, CK7) [75, 107, 110, 159, 241].

Верифікація пухлин легень у практичній роботі патоморфолога вийшла на новий рівень завдяки використанню додаткових високо чутливих методів діагностики, зокрема, ІГХ, яка відіграє важливу роль у визначенні гістогенезу пухлин шляхом верифікації специфічних клітинних антигенів, що є необхідним для коректної класифікації новоутворень [164].

Морфологічне дослідження при НЕН легень обов'язково має бути доповнене ІГХ-тестами. ІГХ посідає чільне місце в діагностиці НЕН бронхо-легеневої локалізації, її використання забезпечує точність діагностики та класифікації, проте, інтерпретація результатів дослідження у деяких ситуаціях

залишається складною. Дотепер є неузгодженість даних кореляції експресії ІГХ-маркерів з ключовими діагностичними чинниками при НЕН легень: з наявністю і вираженістю некрозів, проліферативною активністю, ступенем диференціювання пухлини.

Нейроендокринні ІГХ-маркери використовують за наявності відповідних морфологічних особливостей пухлини («гнізда», палісади, розеткоподібні структури тощо), у малих біопсіях їх застосування є обов'язковим (так, SCLC, з урахуванням клінічних проявів, діагностують у невеликих біоптатах або цитологічних зразках тільки за допомогою ІГХ-дослідження) [171]. Найбільш надійною для диференційної діагностики між недрібноклітинним раком легень і НЕН визнана панель таких маркерів: ChrA, Syn, CD56. За даними літератури, більшість LCNEC і SCLC експресують два і більше нейроендокринних маркерів, 10–20% НЕН легень — лише один, а близько 5–10% високо злоякісних SCLC — жодного [241]. Для карциноїдів зазвичай характерне виражене дифузне цитоплазматичне забарвлення на ChrA, у LCNEC і SCLC — позитивна реакція може бути наявна лише в поодиноких клітинах. Така сама ситуація щодо Syn. Навпаки, експресію CD56 виявляють в основному у SCLC [219]. Проте, характерна органоїдна будова та позитивна експресія хоча б одного з нейроендокринних маркерів (будь-який її рівень) дозволяють встановити діагноз НЕН.

Коротка характеристика основних ІГХ-маркерів, які використовують при НЕН легень, наведена в табл. 1.6.1.

Табл. 1.6.1. Основні ІГХ-маркери при НЕП бронхолегеневої локалізації

ІГХ-маркер	застосування	характеристика
ChrA	підтвердження нейроендокринної природи новоутворення	нейроендокринний маркер (базовий), експресія ChrA швидко втрачається при пухлинній прогресії
Syn		нейроендокринний маркер (базовий), нерідко експресія Syn зберігається за відсутності експресії ChrA
CD56		нейроендокринний маркер; використовується у crashed-біопсіях або при підозрі на низько диференційовану НЕП за відсутності експресії ChrA і Syn
CK7	підтвердження бронхолегеневої локалізації первинної пухлини	маркер багатьох епітеліальних пухлин, зазвичай експресується в карциномах легень, негативний в новоутвореннях кишки
TTF-1		переважно експресується у первинних пухлинах легень
Ki-67	маркери проліферації; визначення агресивності пухлини; у багатьох новоутвореннях є прогностичними чинниками	«золотий стандарт» виявлення проліферуючих клітин; експресується у G1, S, G2, M фазах мітотичного циклу. Рекомендації щодо використання Ki-67 в діагностиці НЕП легень дотепер суперечливі, проте, більшість дослідників при визначенні морфологічного підтипу НЕП бронхо-легеневої локалізації використовують рівень експресії Ki-67
TOP2 $\alpha$		основний маркер реплікації ДНК; експресується у проліферуючих клітинах у пізній S-фазі, G2–M фазах
PPH3		визначення мітотичної активності клітин пухлини
PD-L1	незалежний прогностичний чинник у хворих на рак легень; корелює з наявністю метастазів і поганим прогнозом	ліганд програмованої клітинної смерті (PD-L1) та його рецептор — протеїн програмованої клітинної смерті (PD-1) — ключові молекули «точкового контролю», які зумовлюють прогресію пухлин шляхом негативної регуляції імунної відповіді.

**ChrA** відносять до великої родини розчинних високомолекулярних протеїнів, що продукується нейроендокринними клітинами (щільні, хромафінні гранули) і бере участь у синтезі ними біологічно активних речовин. За даними літератури, ChrA має найкраще співвідношення діагностичної чутливості та специфічності з-поміж інших маркерів НЕН [40, 75, 108]. Однак майже 25% НЕК різної первинної локалізації є ChrA-негативними, і, на думку деяких дослідників, експресія пухлинними клітинами цього маркеру інтерпретована недостатньо [12].

**Syn** в комбінації з іншими нейроендокринними маркерами (Chr, CD56) рекомендований для діагностики НЕН легень [107, 244]. Syn є мембранним глікопротеїдом, у клітинах НЕН він асоційований з дрібними везикулами, подібними до синаптичних. Syn експресується всіма гістологічними варіантами НЕН легень: і високо диференційованими карциноїдами, і агресивними НЕК, однак її вираженість зменшується у міру зниження ступеня диференціювання пухлини, майже у 25% випадків експресію цього маркера не виявляють [114].

**CD56** — власне, не є специфічним маркером нейроендокринного диференціювання, його експресують різні типи імунних клітин, нейрони, гліальні клітини, скелетна мускулатура [220]. CD56 використовують за наявності характерних органоїдних ознак новоутворення. Найбільш яскраве позитивне забарвлення виявляють у випадку низько диференційованих агресивних НЕК бронхолегеневої локалізації [219, 240].

ChrA і Syn є класичними маркерами нейроендокринного диференціювання, оскільки їх епітопи є складовою нейросекторних гранул або синаптичних пухирців. Syn і ChrA традиційно вважають загальними нейроендокринними маркерами, перший з них є більш чутливим, а другий — більш специфічним. Syn асоційований з везикулами, подібними до синаптичних, ChrA — з щільними хромафінними гранулами [12]. Добре відомо, що експресія нейроендокринних маркерів різниться у різних

гістологічних підтипах НЕН легень. Зазвичай ChrA-позитивними є карциноїди і LCNEC, натомість при SCLC його експресію виявляють у поодиноких випадках. Така сама тенденція спостерігається і для Syn. Навпаки, маркер CD56 є найбільш чутливим для діагностики низько диференційованих НЕК. Хоча, 5–10% SCLC не експресують жодного з зазначених нейроендокринних маркерів. Близько 20% агресивних НЕК легень експресують лише 1 з вказаних нейроендокринних маркерів. Використання ІГХ-панелі нейроендокринних маркерів дозволяє виявити навіть досить слабке забарвлення на один з трьох нейроендокринних маркерів у пухлинах з характерною для НЕН морфологією [50, 185, 241].

**СК7** — як і решта кератинів, є проміжним філаментом цитоскелету епітеліальних клітин. Цей цитоплазматичний маркер експресується багатьма нормальними епітеліями та епітеліальними пухлинами, але, незважаючи на такий «широкий діапазон», є корисною складовою ІГХ-панелі для визначення первинної локалізації метастатичних карцином [225]. Так, СК-7-позитивними (з певними варіаціями) є пухлини легень, молочної залози, ендометрію, шийки матки, яєчників, слинних залоз, стравоходу, сечового міхура, а також папілярна нирковоклітинна карцинома. Однак реакція на СК7 зазвичай є негативною у хворих на колоректальний рак, при карциномі Меркеля, плоскоклітинній карциномі, новоутвореннях передміхурової залози, печінки. Для диференційної діагностики між первинною карциномою легень і товстого кишечника може бути використаний додатковий маркер — СК20, відповідно профіль СК7+ / СК20- свідчить на користь первинного ураження легень, СК7- / СК20+ — на користь колоректального раку [51, 152].

**TTF-1** відіграє важливу роль в активації процесів генної транскрипції; в рутинній ІГХ TTF-1 активно використовується для діагностики бронхолегеневих аденокарцином і НЕН легень (особливо дрібноклітинних карцином), а також раку щитоподібної залози. 89–93% первинних пухлин легень є TTF-1-позитивними, зокрема 40–50% LCNEC і майже 85% SCLC.

Чутливість маркеру невисока,  $\geq 30\%$ , проте специфічність (легеневий паттерн) сягає 99% [12, 226, 241]. Однак, інколи TTF-1-позитивними можуть бути первинні новоутворення молочної залози, матки, сечового міхура, ШКТ, шкіри, гіпофіза і т.ін. [17, 27, 116, 139, 199]. Отже, виявлення експресії TTF-1, особливо у метастазах з невизначеного первинного джерела, слід оцінювати обережно, не нехтувати диференційно-діагностичними алгоритмами та розширеною панеллю ІГХ-маркерів (СК7, ChrA, Syn, Ki-67) [164].

СК7 і TTF-1 допомагають розмежувати НЕН ШКТ і бронхогенні НЕН. Ці маркери є помірно чутливими, проте високо специфічними в діагностиці первинних НЕН легень [24]. TTF-1 є єдиними «критично значущим» маркером первинного раку легень, 63–75% аденокарцином є TTF-1-позитивними, у деяких з них виявляють нейроендокринний компонент (якщо він складає 30% і більше, таку пухлину відносять до НЕН). TTF-1 дуже корисний для визначення легеневого походження пухлини при ТС і АС, однак, ІГХ-реакція є позитивною приблизно у 50% випадків, забарвлення зазвичай фокальне і досить слабе. СК7 широко використовують для диференційної діагностики злоякісних новоутворень легень і колоректального раку (майже 70% первинних пухлин легень експресують СК-7, тоді як пухлини кишки є СК7-негативними) [22, 158, 218, 241].

Маркер **Ki-67** — основний і найбільш точний інструмент визначення проліферуючих клітин. Це ядерний білок, зв'язаний з ДНК, що наявний в усіх активних фазах клітинного циклу (переважно у М-фазі) і відсутній у старіючих клітинах і тих, що перебувають у спокої (фаза G0). Індекс проліферації — значущий маркер для визначення гістологічних підтипів НЕП легень, особливо у біоптатах з crush-артефактами, що утруднюють морфологічну оцінку [110]. У випадку ТС Ki-67 не повинен перевищувати 5% (коливається в середньому у межах від 2,3 до 4,15%), АС — 30% (в основному від 9 до 17,8%); високі рівні експресії Ki-67 зазвичай характерні для низько диференційованих НЕК і асоційовані з поганим прогнозом [137, 236, 241].

Оцінка проліферативної активності за Ki-67 — набагато більш зручний і точний метод, ніж підрахунок мітозів, оскільки Ki-67 охоплює більшу частину мітотичного циклу (G1–S–G2 фази) і може «висвітити» проліферуючі клітини за відсутності фігур мітозу [71, 125, 231]. Ki-67 є обов'язковим критерієм грейдінгу НЕН легень (оскільки саме ступінь диференціювання вважається основним прогностичним критерієм у хворих при НЕН бронхо-легеневої локалізації) [96, 140].

Останніми роками класифікація НЕН легень, особливо критерії грейдінгу, а також термінологія зазнали певних змін, що інколи зумовлює непорозуміння між патологами і клініцистами. Ki-67 з допоміжного діагностичного критерію став обов'язковим, базовим, але його рівні, за якими проводиться розмежування ТС і АС, а також АС і низько диференційованих НЕК легень також неодноразово змінювалися, що спричиняє неузгодженість результатів і так нечисленних досліджень. Однак Ki-67 залишається «золотим стандартом» діагностики, в т.ч. диференційної діагностики між різними гістологічними підтипами НЕН легень. Визначення рівня експресії Ki-67 — широко вживаний і добре відтворюваний метод. У багатьох дослідженнях вивчають додаткову діагностичну і прогностичну цінність цього ІГХ-маркера [96, 125, 130].

Ki-67 є релевантним прогностичним фактором при НЕП легень, його високий рівень експресії достовірно пов'язаний зі стадіями III і IV [138]. Коректна діагностика є критично важливою для прогнозу, однак інколи вона суттєво утруднена. І значущість Ki-67 у НЕП легень дотепер є суперечливою. Рівень експресії Ki-67 у високо і помірно диференційованих НЕП легень може «перекриватися» з таким у низько диференційованих, що свідчить про гірший прогноз, ніж визначений за морфологічними критеріями [84, 100]. Це створює певні непорозуміння між патологами та клініцистами. Деякі дослідники вважають рівень експресії Ki-67 недостатньо надійним критерієм, зокрема у малих біопсіях і вогнищах метастазування [15, 41, 71, 126], тому пропонують

використовувати інші маркери проліферації, наприклад, TOP2A, хоча її рівень експресії та прогностичне значення різняться у різних типах новоутворень [5, 23].

**TOP2A.** ДНК-топоізомераза II — фермент, наявний в усіх клітинах еукаріот, він необхідний для таких процесів як конденсація хромосом під час мітозу, розділення реплікованих хроматид, а також каталізу тимчасових розривів та повторного відновлення цілісності ланцюгів ДНК, що дозволяє цим ланцюгам «проходити один крізь одний», змінюючи топологію ДНК. Ген, що кодує  $\alpha$ -ізоформу ДНК-топоізомерази II (TOP2A), локалізований на 17-й хромосомі (17q21.2), він нерідко зазнає ураження в онкогенезі (як за рівнем експресії, так і кількістю копій), а також є мішенню для деяких хіміотерапевтичних агентів; його мутації можуть спричинити виникнення як хромосомної нестабільності, так і лікарської стійкості [33]. TOP2A — ядерний білок, який регулює архітектуру ДНК під час мітотичного циклу; його вважають одним з додаткових маркерів проліферації, пов'язаним з рівнем експресії Ki-67 та ступенем диференціювання клітин пухлини; однак прогностична цінність цього маркеру різниться при різних онкологічних захворюваннях [5, 118, 122]. Було показано, що підвищення експресії Ki-67 і TOP2A корелюють між собою, а також з низьким ступенем диференціювання клітин пухлини, так само як і з стадією захворювання та прогнозом [241]. І хоча паттерн експресії цих маркерів у клітинному циклі різниться (експресія Ki-67 є найвищою у фазі G2/M, тоді як TOP2A, переважно пов'язана з синтезом ДНК — у пізній S і G2-M фазах), вони вважаються критично важливими для визначення статусу проліферації і є корисними інструментами оцінки агресивності злоякісних новоутворень [142].

Фосфогістон H3 (**PHH3**) — один з додаткових, мітоз-специфічних ПГХ-маркерів; його експресія широко вивчалася за різноманітної онкопатології, проте, при пухлинах легень вона вивчена недостатньо [221, 227]. PHH3 дозволяє виявити мітози, які дослідник може пропустити при звичайному



підрахунку МІ, при цьому результат дослідження вважається більш надійним і відтворюваним, ніж при оцінці експресії Ki-67 [53, 89, 213]. Використання РННЗ дозволяє більш точно оцінити проліферацію клітин пухлини, з прекрасною узгодженістю між дослідниками, саме дослідження потребує набагато менше часу, ніж стандартний підрахунок МІ на гістологічних препаратах, забарвлених гематоксиліном і еозином [93, 149, 228].

Вважається, що ступінь диференціювання пухлини можна визначити більш точно за допомогою РННЗ, проте, це може призвести до збільшення частки високо злоякісних новоутворень [221].

Автори деяких досліджень наголошують, що РННЗ може бути використаний як предиктор метастатичного ураження [149] та виживаності [221]. Однак у різних пухлинах діагностична та прогностична цінність МІ, ІГХ-маркерів проліферації Ki-67 і РННЗ суттєво різняться [213]. А дані щодо діагностичної та прогностичної цінності РННЗ у НЕП легень дуже обмежені [53].

**PD-L1.** Ліганд програмованої клітинної смерті (PD-L1) та його рецептор — протеїн програмованої клітинної смерті (PD-1) — ключові молекули «точкового контролю», які зумовлюють прогресію пухлин шляхом негативної регуляції імунної відповіді. PD-L1 експресується на поверхні пухлинних клітин і зв'язується з PD-1 на поверхні активованих Е-лімфоцитів, спричиняючи супресію останніх, що в результаті дозволяє клітинам пухлини уникати дії протипухлинного імунітету [135, 224, 248]. Блокування PD-L1 шляхів вважається перспективною методикою при різних агресивних новоутвореннях з поганим прогнозом, при яких терапевтичні альтернативи досить обмежені (зокрема, при меланомі, раку нирок и легень тощо) [31, 59, 60, 77, 78, 123, 162, 210, 224]. Також, за даними деяких досліджень, відзначене невелике, але достовірне збільшення загальної виживаності хворих на дрібноклітинний рак легень при додаванні до схеми хіміотерапії антитіл до

PD-L1 [166]. У деяких публікаціях дискутується потенційне предиктивне значення PD-1 і PD-L1 [11, 38].

За даними літератури, експресію PD-L1 виявляють майже у 50% випадках недрібноклітинного раку легень. Однак лише невелика частка НЕП бронхолегеневої локалізації — близько 10% LCNEC і 5% SCLC є PD-L1-позитивними, в карциноїдах цей біомаркер зазвичай не експресується [202, 208, 216].

Підвищення рівня експресії PD-L1 клітинами пухлини відіграє важливу роль у здатності уникати ними імунного контролю [153, 188]. В експерименті рівень експресії PD-L1 клітинами лінії метастатичної пухлини був достовірно вищим, ніж неметастатичної [135]. За даними літератури, PD-L1 можна розглядати як незалежний прогностичний чинник у хворих на рак легень [188]. У інших публікаціях зазначається, що в деяких інших злоякісних новоутвореннях PD-L1 корелює з наявністю метастазів і поганим прогнозом [58, 60, 102, 153, 161, 188, 202, 216]. Загальна і безрецидивна виживаність за позитивної експресії PD-L1 є нижчою, ніж у PD-L1-негативних випадках. Однак дані про взаємозв'язок PD-L1 з біологічними характеристиками пухлини, її поведінкою досить суперечливі [60, 79].

Прогностична цінність PD-L1 у бронхолегневих НЕП потребує уточнення; дані літератури з цього приводу малочисленні та суперечливі. За даними останніх досліджень, характеристика мікрооточення в пухлинах легень є недостатньо інформативною для прогнозу, натомість експресія PD-L1 корелює з виснаженням Т-клітин незалежно від гіпоксії у клітинах пухлини і свідчить на користь пухлинної прогресії [188, 202].

## **Висновки до розділу 1**

Враховуючи все вищесказане, до даного розділу можна зробити такі висновки. НЕП легень — група гетерогенних, досить рідкісних пухлин (до 2%

в структурі загальної онкопатології), хоча, за даними деяких авторів, їх частка сягає 20% у структурі первинних злоякісних новоутворень легень. Частота виявлення НЕН легень за останні 30 років хоч і повільно, але невпинно збільшується, в основному завдяки удосконаленню методів та протоколів діагностики. Майже у 95% випадків НЕН легень є нефункціональними, специфічні або виражені клінічні прояви відсутні, нерідко їх діагностують випадково або на поширених стадіях, через виявлення метастазів. Від 40 до 75% пацієнтів на момент встановлення діагнозу мають регіонарні або віддалені метастази, що суттєво скорочує тривалість їх життя (до 8–17 міс). Незважаючи на чималу кількість досліджень у різних країнах світу, дані щодо епідеміології, ІГХ-особливостей, діагностичних і прогностичних чинників при НЕН легень розрізнені та досить суперечливі. Нюанси термінології та класифікації, неодноразовий її перегляд з суттєвими поправками спричиняють певну неузгодженість серед науковців і практикуючих лікарів щодо розуміння біології цих пухлин і трактування результатів досліджень. Більшість досліджень НЕН легень є одноцентровими, ретроспективними і включають невелику кількість спостережень — цього замало аби зробити статистично вірогідні висновки. У Канцер-реєстрі України взагалі не згадуються НЕН легень, впродовж останніх 20 років не було опубліковано жодної вітчизняної монографії, присвяченої НЕН легень (за даними УкрІНТІ станом на грудень 2020 р.). На сьогоднішній день базовими критеріями для діагностики НЕН легень є поєднання морфологічних та ІГХ-критеріїв. Проте, діагностична і прогностична цінність деяких з них дотепер є предметом наукових дискусій. Відсутніх чітких критеріїв диференційної діагностики між різними гістологічними варіантами НЕН легень, велика кількість спірних питань щодо клінічного прогнозу захворювання суттєво ускладнюють ситуацію і потребують подальших досліджень.

## РОЗДІЛ 2

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

## 2.1. Загальна характеристика матеріалів дослідження

За даними проведеного нами ретроспективно-проспективного дослідження, у період з 2010 по 2020 р. у КМКОЦ 1237 пацієнтам було діагностовано НЕН різної локалізації. НЕН легень (462 спостереження) посіли друге місце за частотою, незначно поступившись НЕН ШКТ (табл. 2.1.1, 2.1.2).

Табл. 2.1.1. Виявлення НЕН бронхо-легеневої локалізації у пацієнтів, які звернулися до КМКОЦ у період спостереження з 2010 по 2020 рр.

НЕН		Кількість спостережень	
		абс.	%
«типові»	ШКТ	522	42,13
	легені	462	37,35
	парагангліома	83	6,71
	феохромоцитома	56	4,53
	пухлина Меркеля	51	4,12
рідкісні	тимус	11	0,89
	молочна залоза	10	0,81
	щитоподібна залоза	9	0,73
	сечовий міхур	8	0,65
	яєчник	8	0,65
	матка	5	0,40
	нирка	4	0,32
	носоглотка	4	0,32

Табл. 2.1.2. Розподіл НЕН бронхо-легеневої локалізації за весь період спостереження (2010–2020 рр.) за гістотипом і віком пацієнтів.

Вік, років	Загальна кількість спостережень НЕН легень 2010–2020 рр. (n=462)							
	ТС		АС		LCNEC		SCLC	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
18–44 років	6	1,30	43	9,31	15	3,25	32	6,93
45–59 років	4	0,87	38	8,23	30	6,49	96	20,79
60–74 років	1	0,22	39	8,44	42	0,09	100	21,65
75–90 років	0	0	2	0,43	3	0,65	11	2,38
Всього	11	2,38	122	26,41	90	19,49	239	51,73

Безпосередньо дисертаційне дослідження проведене з залученням гістологічних блоків НЕН легень (матеріал 36 резекцій і 77 біопсій (54,5% біопсій виявилися малими або роздробленими)), отриманих від 113 пацієнтів, яких лікували у Київському міському клінічному онкологічному центрі в період з 2010 по 2020 р.

Проведення дослідження схвалене комісією з питань біоетичної експертизи при НМУ імені О.О. Богомольця (протокол №118 від 18 січня 2019 р.).

Ми використовували стандартну гістологічну техніку. Зразки тканини вміщували у 10% розчин формаліну щонайменше на 24 год. Дегідратація здійснювалася у серії спиртів з висхідною концентрацією з подальшим виготовленням парафінових блоків. З кожного блоку робили зрізи товщиною 5 нм, депарафінували і забарвлювали гематоксиліном і еозином. Гістологічні препарати вивчали під світловим мікроскопом Carl Zeiss® Primo Star з фотофіксацією.

В усіх випадках проведене гістологічне дослідження (включаючи визначення нейроендокринної морфології, некрозу, ступеня диференціювання пухлини). Підрахунок мітозів здійснений на гістологічних препаратах, забарвлених гематоксиліном і еозином, мітотичний індекс оцінювали як

кількість мітозів на 10 полів зору. Всі випадки класифіковані за 2021 WHO Thoracic Tumors Classification і AJCC Cancer Staging Manual, 8<sup>th</sup> ed. [1, 236]. Також проведене ІГХ-дослідження до призначення хворим хіміотерапії (з використанням маркерів ChrA, Syn, CD56, TTF-1, CK7, Ki-67, TOP2A, PNH3, PD-L1). Результати морфологічного та ІГХ-дослідження оцінені двома незалежними патологами без попереднього надання їм клінічних даних пацієнта. Історії хвороби та медичні картки використані для оцінки клінічних знахідок та оцінки виживаності пацієнтів.

Вибірка складалася з 91 пацієнта чоловічої статі та 22 жіночої; вік хворих від 19 до 77 років, у середньому 59,2 року ДІ 95% (56,9–61,4).

Визначити TNM і, відповідно, стадію НЕН легень вдалося у 90 (79,65%) зі 113 спостережень. НЕН бронхолегеневої локалізації діагностовані на I стадії у 16 (17,78%) хворих, на II стадії — у 3 (3,33%), на III — у 29 (32,22%), на IV — у 42 (46,67%) випадках.

Період спостереження суттєво різнився — від 10 діб до 7,1 року, в середньому становив 2,84 міс. Наслідки не вдалося простежити у 34 (30,09%) випадках. 29 (25,66%) хворих померли, тривалість життя після встановлення діагнозу становила в середньому 1,57 міс. Згідно записів у медичній документації, 47 (41,59%) пацієнтів живі, у такому випадку період спостереження також суттєво різнився і у середньому становив 4,22 міс.

Зразки НЕН легень мали характерну органоїдну будову: «гнізда», «розетки», трабекули та експресували один або декілька нейроендокринних маркерів (ChrA, Syn або CD56).

Визначено кореляцію між морфологічними чинниками та експресією ІГХ-маркерів, оцінено статистичну вірогідність отриманих показників в якості прогностичних чинників при НЕН бронхолегеневої локалізації.

Схематичне зображення проведеного дослідження та деякі узагальнені результати представлені на рис. 2.1.1 і в табл. 2.1.3.

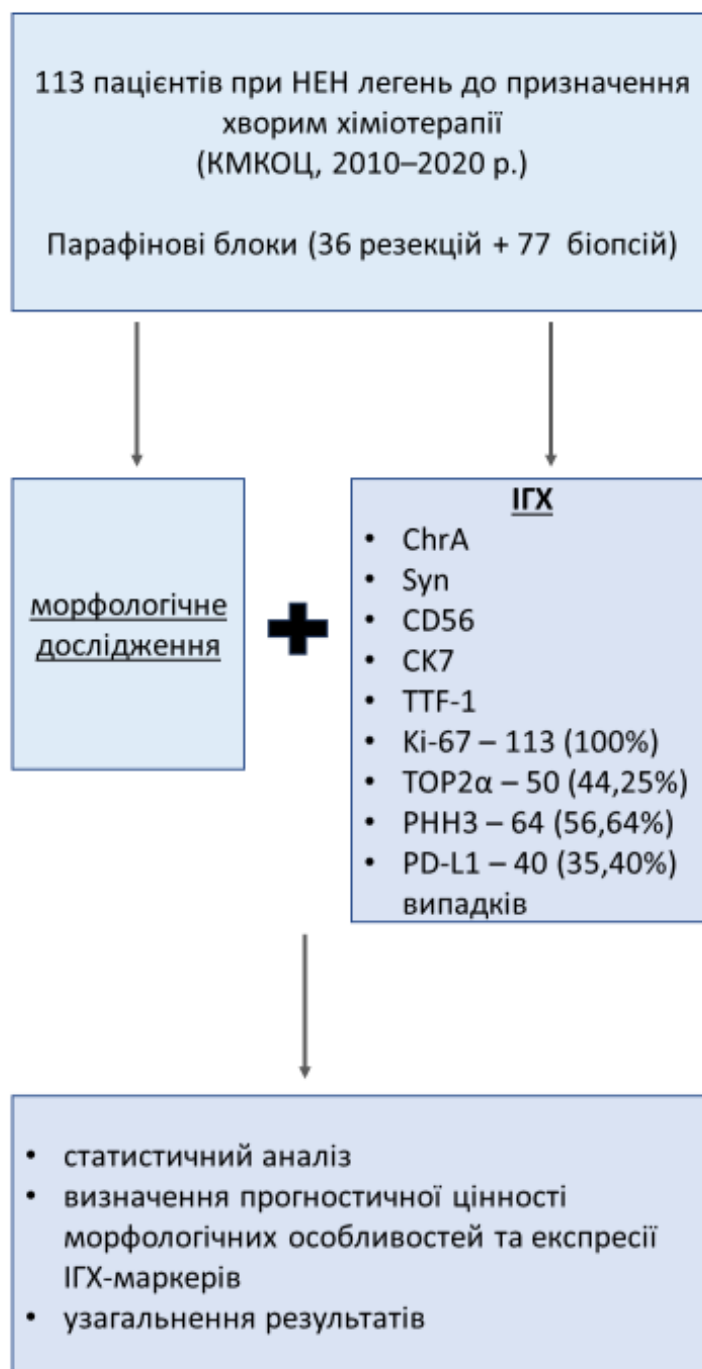


Рис. 2.1.1. Схематичне зображення проведеного дослідження.

Табл. 2.1.3. Узагальнені дані по проведених дослідженнях

Показник	Значення		ІГХ	Значення
Всього спостережень	113 (100%)		<i>ChrA</i> виявлена у 84 (74,34%) зразках НЕН легень	виражена — 64 (76,20%)
Чоловіки	91 (80,53%)			помірна — 10 (11,90%)
Жінки	22 (19,47%)			слабка вогнищева — 10 (11,90%)
Співвідношення Ч:Ж = 4,13:1			<i>Syn</i> експресія виявлена у 83 (73,54%) випадках	виражена — 71 (85,54%)
Вік хворих від 19 до 77 років, у середньому 61,5±11,8 років				помірна — 2 (2,41%)
18–44 років	14 (12,39%)			слабка вогнищева — 10 (12,05%)
45–59 років	34 (30,09%)		<i>CD56</i> експресія виявлена у 18 (15,90%) зразків	виражена — 11 (61,11%)
60–74 років	61 (53,98%)			слабка вогнищева — 7 (38,89%)
75 років і старше	4 (3,54%)			<i>CK7</i> експресія виявлена у 67 (59,29%) випадках
На момент встановлення діагнозу	mts у лімфовузлах	77 (68,14%)	помірна — 8 (11,94%)	
	mts у лімфовузлах і віддалені	42 (37,17%)	слабка вогнищева — 4 (5,97%)	
НЕН легень G1 (TC)		9 (7,96%)	<i>TTF-1</i> експресія виявлена у 51 (45,13%) спостереженні	виражена — 30 (58,82%)
НЕН легень G2 (AC)		40 (35,40%)		помірна — 5 (9,81%)
НЕН легень G3 — 69 (61,06%)	LCNEC	20 (17,70%)		слабка вогнищева — 16 (31,37%)
	SCLC	44 (38,94%)		

Експресія Ki-67 визначена у 113 (100%) випадках. Оцінено кореляцію експресії маркера Ki-67 з морфологічними та іншими ІГХ критеріями, вивчено цінність рівня експресії Ki-67 як індикатора метастатичного ураження на момент встановлення діагнозу НЕН легень.

У 50 випадках визначали експресію додаткового маркера проліферації TOP2A. Ми аналізували кореляцію між рівнями експресії TOP2A і Ki-67. Також ми оцінили зв'язок між рівнем експресії TOP2A, наявністю великих і



поширених вогнищ некрозу та метастазів. Виживаність пацієнтів оцінювали з урахуванням рівня експресії TOP2A.

Експресію PNH3 оцінена на 64 блоках НЕП легень, отримані результати порівнювали з показниками MI, Ki-67, вираженістю некрозів, наявністю метастазів. Також оцінена виживаність хворих в залежності від отриманих показників мітотичного індексу, Ki-67 і PNH3.

У нашому дослідженні основну увагу приділили експресії PD-L1 та її зв'язку з клініко-патологічними характеристиками НЕП легень на поширеній стадії. ІГХ з використанням антитіл до PD-L1 проведена на матеріалі 40 біопсій при метастатичних НЕН легень без таргетної терапії: 13 (32,5%) спостережень Grade 2 і 27 (67,5%) Grade 3. Оцінювали кореляцію експресії PD-L1 з певними клініко-патологічними характеристиками: віком і статтю пацієнтів, ступенем диференціювання НЕП, індексом Ki-67, вогнищами некрозу, фіброзом, лімфоцитарною інфільтрацією, ангиогенезом, наявністю віддалених метастазів та виживаністю хворих без таргетної терапії.

## **2.2. Методи і методики дослідження**

Для вирішення завдань дослідження та досягнення поставленої мети використані загальноклінічні, гістологічні, ІГХ-методи дослідження та статистичний аналіз даних.

Ми використовували стандартну гістологічну техніку. Зразки тканини НЕН легень були фіксовані у % розчині формаліну щонайменше впродовж 24 год., зневоднені в серії спиртових розчинів підвищення концентрації та залиті в парафін. В подальшому з блоків були виготовлені зрізи товщиною 5 мкм, депарафіновані та забарвлені гематоксиліном і еозином.

Гістологічне дослідження і фотофіксація здійснені за допомогою світлового мікроскопа Carl Zeiss® Primo Star.

Всі ІГХ-реакції проведені з використанням системи візуалізації Dako En Vision FLEX.

Всі розрахунки здійснені за допомогою програми Microsoft Excel.

Всі випадки оцінені двома патологами без попереднього надання їм даних історій хвороби пацієнта.

Всі спостереження класифіковані за 2021 WHO Thoracic Tumors Classification і AJCC Cancer Staging Manual, 8<sup>th</sup> ed [236].

Окремо проаналізовані дані історій хвороби пацієнтів, яких лікували на базі Київського міського онкологічного центру з приводу НЕН бронхолегеневої локалізації у період з 2010 по 2020 р.

Загальну виживаність пацієнтів визначали як період від дати встановлення діагнозу НЕН бронхолегеневої локалізації до смерті пацієнта або дати останнього спостереження.

Некрози визначали на слайдах, забарвлених гематоксиліном і еозином. У типових карциноїдах некрози не виявляли; у атипових карциноїдах були наявні невеликі вогнища некрозу; у низько диференційованих НЕП легень зазвичай виявляли численні дрібні некрози або великі вогнища некрозу, нерідко з крововиливами. Підрахунок мітозів здійснений на гістологічних препаратах, забарвлених гематоксиліном і еозином, мітотичний індекс оцінювали як кількість мітозів на 10 полів зору.

Згідно чинної класифікації, з урахуванням МІ, наявності некрозів, рівня експресії Ki-67 спостереження розподілені на 4 гістологічні типи. Оскільки морфологічні критерії для різних типів НЕН легень «перекриваються», ІГХ-дослідження було обов'язковим у всіх випадках. Задля спроби усунути неузгодженість щодо експресії «базових» маркерів у НЕН легень, ми проаналізували рівні Ki-67, нейроендокринних маркерів, маркерів для визначення первинної органної локалізації та їх кореляцію між собою і з морфологічними показниками. З метою оптимізації діагностики досліджена експресія додаткових ІГХ-маркерів (TOP2A, PNH3, PD-L1), оцінена їх діагностична і прогностична значущість.

Для визначення експресії ІГХ-маркерів використані моноклональні антитіла anti-Ki-67, clone MIB-1 (Dako, USA); anti-ChrA, clone SP12 (Invitrogen,

Thermo Fisher Scientific, USA); anti-Syn, clone DAK-SYNAP (Dako, Denmark); моноклональні мишачі антитіла anti-human CB56, clone 123C3 (Dako, Denmark) і anti-TTF-1 clone 8G7G3/1 (Dako, Denmark); моноклональне антитіло anti-human CK7, clone OV-TL 12/30 (Dako, Denmark).

ChrA і Syn використані в усіх випадках. Якщо забарвлення на нейроендокринні маркери було сумнівним або негативним, додатково застосовували маркер CD56 (у 18 (15,90%) спостереженнях). TTF-1 і CK7 використані для підтвердження легеневого походження НЕН, особливо у випадках з невідомою первинною локалізацією пухлини.

Ki-67 оцінювали як процент пухлинних клітин з позитивним ядерним забарвленням. Для підрахунку у кожному зі зразків обирали 5 полів зору мікроскопа при збільшенні  $\times 200$ ; у кожному з полів зору рахували 100 клітин новоутворення для визначення інтенсивності ІГХ-реакції та проценту позитивних клітин. Показник Ki-67 до 5% відповідав ТС, від 6 до 30% — АС, понад 30% — низько диференційованим НЕК. Експресію решти ІГХ-маркерів (TTF-1, CK7, ChrA, Syn, CD5) визначали за мембранним / цитоплазматичним забарвленням, за кількісною реакцією від негативної (0) до слабкої експресії (1+) та вираженої (2+), проте, наявність будь-якого забарвлення вважали позитивним.

Нестача чітких діагностичних і прогностичних критеріїв суттєво ускладнює оцінку клінічної поведінки НЕН легень та прогноз. Отже, проста і точна діагностика та оцінка прогностичної цінності маркерів проліферації видається дуже важливою. Крім «стандартних» ІГХ-маркерів у нашому дослідженні з метою оптимізації діагностики та прогнозу НЕН легень вивчена експресія додаткових маркерів: TOP2A, PNH3, PD-L1.

Для визначення експресії TOP2A використане моноклональне антитіло Topoisomerase II alpha (clone EP93, Epitomics, France) — 50 реакцій. Враховували тільки ядерне забарвлення та його інтенсивність в ІГХ-реакції на TOP2A. При дослідженні кожного зразка вивчали 5 полів зору мікроскопа при збільшенні  $\times 200$ , у кожному полі зору оцінювали інтенсивність забарвлення і

його показник у % з розрахунку на 100 клітин пухлини. Дані щодо рівнів експресії TOP2A та їх оцінки є дещо суперечливими. Різні автори пропонують використовувати широкий спектр граничних значень TOP2A, але переважно  $\geq 30\%$  [5, 138]. У нашому дослідженні рівні експресії TOP2A були різними (від 0 до 85%); показник TOP2A  $\geq 5\%$  вважали позитивним; TOP2A  $\geq 35\%$  оцінений як надмірна експресія.

Ми намагалися більш точно (порівняно з підрахунком MI) і коректно оцінити рівень експресії додаткового ПГХ-маркера проліферації PNH3 (використаний кролячий поліклональний PNH3 (Diagnostic Biosystems, USA)) — 64 реакції у зразках НЕН легень Grade 2 і Grade 3. При оцінці результатів реакції враховували лише ядерне забарвлення. Для кожного зразка досліджували 5 полів зору (збільшення  $\times 200$ ), у кожному полі зору визначали % позитивних (забарвлених) клітин.

У нашому дослідженні основну увагу приділили експресії PD-L1 та її зв'язку з клініко-патологічними характеристиками метастатичних НЕН легень. ПГХ з використанням антитіл до PD-L1 (clone 22C3, Dako, USA) проведена на матеріалі 40 біопсій: 13 (32,5%) спостережень Grade 2 і 27 (67,5%) Grade 3 на поширеній стадії. Рівень експресії PD-L1 оцінювали з урахуванням інтенсивності та площі реакції (0–100%) [155, 202, 206]. ПГХ-реакцію з PD-L1 вважали позитивною при забарвленні  $\geq 1\%$  клітин пухлини [198]. Оцінювали відсоток клітин з позитивним мембранним забарвленням; отримані результати розподілені на три групи: група 0 — експресія PD-L1  $< 1\%$ ; група 1 — PD-L1 1–5%; група 2 — PD-L1  $\geq 6\%$ . Найвищий рівень експресії PD-L1 становив 20%, надмірна експресія PD-L1 ( $> 30\%$ ) у нашому дослідженні не виявлена. Інтенсивність реакції у всіх випадках була локальною, слабкою або помірною.

Протокол дослідження відповідав Гельсенській декларації і був затверджений комісією з питань біоетичної експертизи при НМУ імені О.О. Богомольця (протокол №118 від 18 січня 2019 р.).

### 2.3. Статистична обробка результатів

Статистичний аналіз проведений за допомогою програм IBM SPSS “Statistics 28” (ліцензія №Z125-3301-14) та EZR 1,35 (R statistical software version 3.4.3, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) [81].

Під час проведення дослідження використані методи непараметричної статистики.

Коефіцієнт Каппа Коена був використаний для обчислення узгодженості між патологами.

Критерій рангової кореляції Спірмена (рівень статистичної вірогідності прийнятий на рівні 0,05) використаний для визначення кореляційного зв'язку між показниками експресії ПХ-маркерів, наявністю і вираженістю некрозу, індексом проліферації (Ki-67) і ступенем диференціювання пухлини.

Розподіл показників Ki-67 і TOP2A оцінений з використанням U-критерію Манна-Уїтні. Тест рангової кореляції Спірмена використаний для оцінки ступеня взаємозв'язку рівнів експресії Ki-67 and TOP2A с залежності від наявності екстенсивних вогнищ некрозу. ROC-крива використана для визначення прогностичної цінності TOP2A. Оцінка виживаності пацієнтів здійснена за допомогою методу Каплан-Мейєра і моноваріантної регресійної Соx-моделі співвідношення ризиків. Лог-ранговий критерій використаний для визначення значущості відмінностей виживаності у групах хворих з різними показниками експресії TOP2A.

Параметри мітотичного індексу, Ki-67, РННЗ оцінювали за допомогою критерію Манна-Уїтні, кореляції Спірмена. 95% ДІ вирахований за допомогою адаптованого методу Вальда. Для оцінки виживаності використані критерій Каплан-Мейєра та логранк тест.

Для визначення рівня експресії Ki-67 за відсутності та за наявності регіонарних і віддалених метастазів використаний критерій Крускала-Уолліса з поправкою Холма-Бонферроні. ROC-крива використана для визначення цінності рівня експресії Ki-67 як індикатора ймовірного поширеного

метастатичного ураження лімфатичних вузлів на момент встановлення діагнозу НЕН легень.

Оцінювали кореляцію експресії PD-L1 з певними клініко-патологічними характеристиками: віком і статтю пацієнтів, ступенем диференціювання НЕН, індексом проліферації Ki-67, вогнищами некрозу, фіброзом, лімфоцитарною інфільтрацією, ангиогенезом, наявністю віддалених метастазів та виживаністю хворих з використанням тестів Манна-Уїтні, Крускала-Уолліса, Кендала, а також рангової кореляції Спірмена. Кокс-регресія використана для аналізу виживаності.

## **Висновки до розділу 2**

Проведене комплексне морфологічне та ІГХ-дослідження на гістологічних блоках від 113 пацієнтів при НЕН легень (операційний матеріал — 36 випадків, біопсійний — 77). У вибірці суттєво переважали чоловіки (співвідношення чоловіки / жінки = 4,13:1), вік хворих від 19 до 77 років, у середньому  $(61,5 \pm 11,8)$  років. Зазвичай НЕН бронхолегеневої локалізації діагностували у пацієнтів віком 59,5 років, 95% ДІ (53,8–64,3). Бронхолегеневі НЕН Grade 1 (ТС) діагностований у 7,96% спостережень, Grade 2 (АС) — у 35,4%, Grade 3 (низько диференційовані агресивні LCNEC і SCLC) — у 56,64%. На момент встановлення діагнозу регіонарні метастази виявлені у 65,49% хворих, віддалені — у 38,05%. Гістологічні характеристики та експресію ІГХ-маркерів Ki-67, ChrA, Syn, CD56, TTF-1, CK7 вивчено в усіх випадках. Додатково вивчено експресію TOP2A (реакцій) PNH3 (64 реакції), PD-L1 (40 реакцій).

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### **3.1. Загальна характеристика вибірки при нейроендокринних новоутвореннях легень**

За результатами проведеного нами дослідження, з 2010 по 2020 р. у патоморфологічному відділенні КМКОЦ діагностовано 462 випадки НЕН легень, що склало 37,4% спостережень у структурі всіх виявлених за цей час нейроендокринних пухлин (II місце за частотою після НЕН ШКТ), що в цілому збігається з даними дослідників [20, 84, 160].

Серед цього числа спостережень були 2 (0,4%) випадки, коли НЕН легень виявилися складовою досить рідкісного аутосомно-домінантного синдрому множинної нейроендокринної неоплазії I типу (MEN-1) з ураженням кількох органів (тимуса, паращитоподібних залоз, підщлункової залози, наднирників), виникнення кого зумовлене мутацією гену 11q13 довгого плеча 11 хромосоми, що спричиняє нерегульовану проліферацію нейроендокринних клітин. Також, за даними медичної документації, у 4 (0,9%) хворих на момент встановлення діагнозу був наявний карциноїдний синдром. За даними літератури, карциноїдний синдром виявляють приблизно у 1,5–3% випадків при НЕН легень, і майже у 2% таких хворих діагностують синдром Кушинга через ектопічну продукцію пухлинними клітинами адренокортикотропного гормону [9, 13, 846 117, 165, 184, 192, 211, 249]. Безпосередньо у дисертаційне дослідження випадки MEN-1 і карциноїдного синдрому не включені, оскільки цих пацієнтів не лікували у КМКОЦ, їм лише було встановлено діагноз НЕН легень за даними гістологічного та ІГХ дослідження.

Безпосередньо у дисертаційне дослідження включені 113 пацієнтів при НЕН легень, яких лікували у КМКОЦ за цей період часу.

В роботу включені по 6 (5,31%) спостережень за 2010 і 2012 рр., 13 (11,5%) — за 2011 р., по 9 (8,0%) випадків за 2013 і 2015 рр., 11 (9,7%) — за

2014 р., 3 (2,7%) — за 2016 р., по 8 (7,0%) — за 2017 і 2018 рр.; у 2019 і 2020 рр. кількість спостережень НЕН бронхолегеневої локалізації збільшилася — відповідно 21 (18,56%) і 19 (16,8%) спостережень.

Дослідження проведене на матеріалі 36 операцій і 77 біопсій, 42 (54,5%) з яких були дрібними і/або розробленими. В усіх випадках проведені гістологічне та ІГХ-дослідження. Вік хворих від 19 до 77 років, у середньому  $61,5 \pm 11,8$  року. Співвідношення чоловіки / жінки становило 4,13:1. Градація спостережень за Grade здійснена за рівнем експресії Ki-67 згідно з класифікацією ВООЗ, 2021 [140, 212]: Ki-67  $\leq 5\%$  — Grade 1 (TC), Ki-67 5–30% — Grade 2 (AC), Ki-67 30–100% — Grade 3 (LCNEC і SCLC) з урахуванням наявності та вираженості некрозу [48, 72, 110, 205].

За класифікацією TNM при TC у більшості випадків розміри новоутворення відповідали T1 ( $\leq 3$  см у найбільшому вимірі), при AC — T1–T2 ( $>3$ , але  $\leq 5$  см), при LCNEC — T3 ( $>5$ , але  $\leq 7$  см), при SCLC переважно виявляли T4 ( $> 7$  см). Стадіювання НЕН легень у нашій роботі відповідало такому у великій вибірці і даним літератури [1, 96].

У нашому дослідженні було 16 (17,8%) спостережень НЕН легень I стадії, 3 (3,3%) — II стадії, 29 (32,2%) — III стадії та 42 (46,7%) — IV стадії. У 23 (20,4%) випадках стадію визначити не вдалося через брак достовірних відомостей про розміри первинної пухлини і статус регіонарних лімфатичних вузлів.

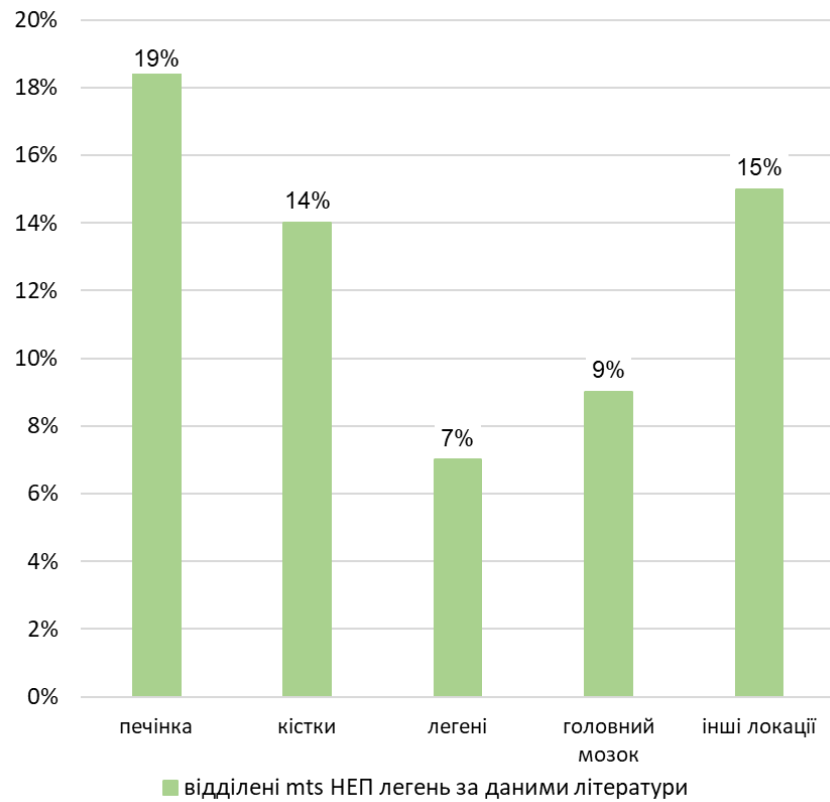
Згідно даних медичної документації, хіміотерапію після встановлення морфологічного діагнозу НЕН легень було призначено 54 (47,8%) хворим (різні схеми і кількість курсів), також 4 з них призначали променеви терапію (зазвичай за метастатичного ураження головного мозку).

Період спостереження за пацієнтами суттєво різнився — від 10 діб до 7,1 року, і в середньому становив 2,84 міс. Наслідки не вдалося простежити у 34 (30,1%) випадках. 29 (25,7%) хворих померли, при цьому тривалість життя після встановлення діагнозу становила в середньому 1,57 міс. Згідно записів у

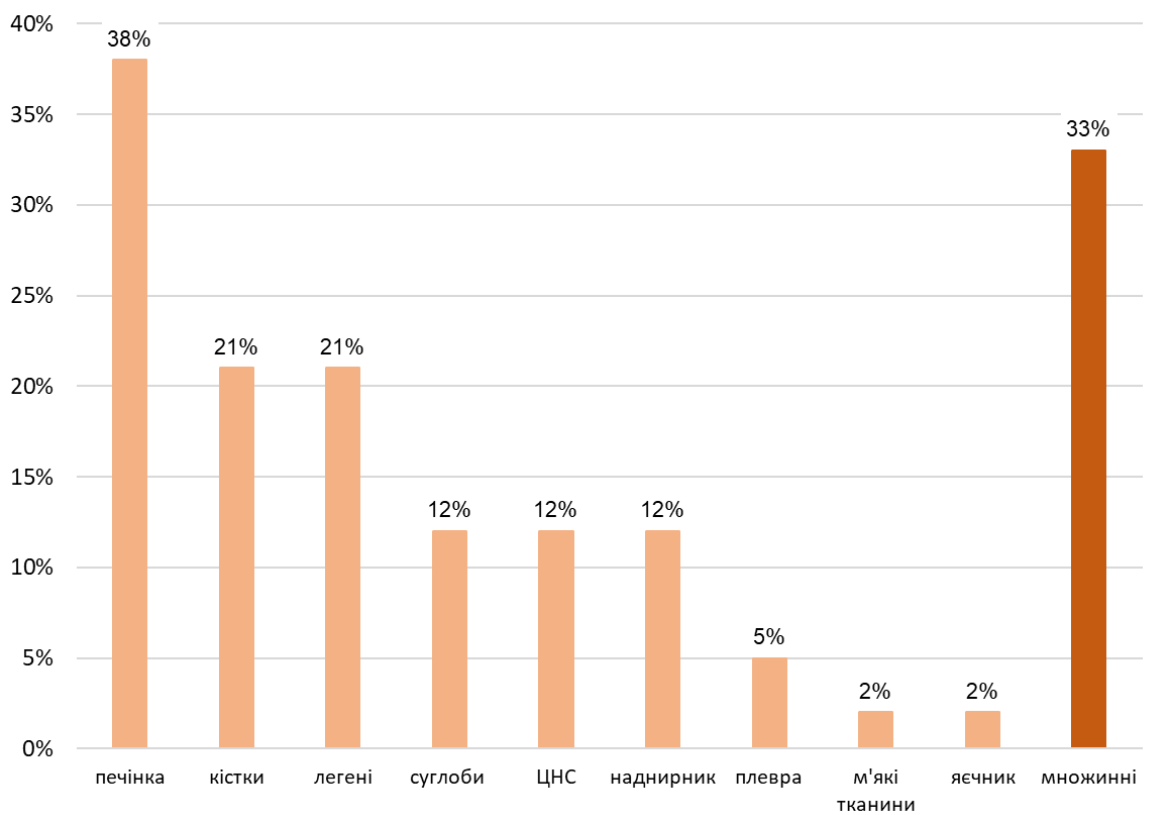


медичній документації, 47 (41,59%) пацієнтів живі, у такому випадку період спостереження також суттєво різнився і у середньому становив 4,22 міс. Як зазначалося вище, у НЕН легень практично відсутня секреторна активність або вона дуже низька, клінічні прояви неспецифічні і слабо виражені, нерідко такі пухлини діагностують на пізніх стадіях захворювання, також для них характерний більш агресивний перебіг [47, 108].

На момент встановлення діагнозу НЕН легень регіонарні метастази виявлені у 74 (65,49%) хворих. При цьому ізольоване ураження перибронхіальних та інтрапульмональних лімфатичних вузлів відзначено лише у 2 (1,77%) випадках, ураження лімфатичних вузлів середостіння — у 45 (39,82%), лімфатичних вузлів голови та шиї, надключичних, пахвових і віддалених локалізацій — у 27 (23,89%); у 6 (5,31%) хворих встановлено попередній клінічний діагноз «лімфома». У 19 (16,81%) спостереженнях вибірки інформація про ураження лімфатичних вузлів відсутня. У 43 (38,05%) пацієнтів виявлено віддалені метастази, майже у третині випадків (14 спостережень) вони були множинними (рис. 3.1.1).



А



Б

Рис. 3.1.1. Віддалені метастази при НЕП легень за даними літератури (А) [34, 56, 69, 86, 177, 247] і за даними власного дослідження (Б).

Структура спостережень НЕН легень за гістологічним типом наведена на рис. 3.1.2.

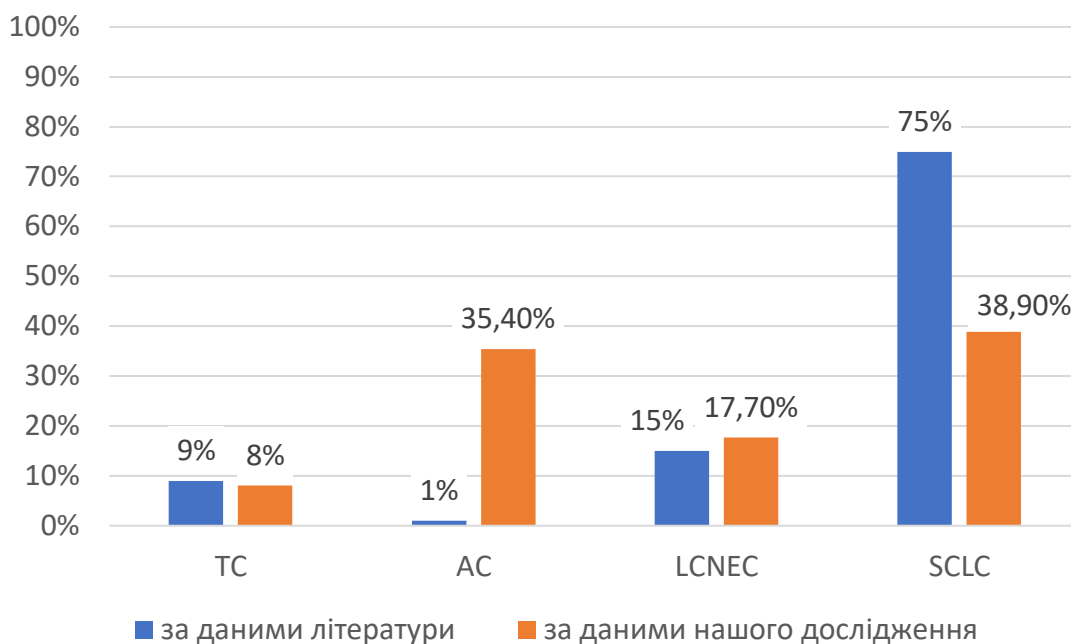


Рис. 3.1.2. Структура власних спостережень НЕН легень за гістологічним типом у порівнянні з даними літератури [128, 137].

У більшості випадків у нашому дослідженні діагностовано АС, а не ТС, який, за даними літератури, переважає у структурі карциноїдних пухлин легень. Так, за даними інших авторів, понад 80% спостережень припадає на ТС [20, 41, 76, 229], за даними нашого дослідження, пропорція виявилася оберненою — 81,6% всіх карциноїдів були атиповими. Вочевидь, такі розбіжності спричинені неодноразовими значними змінами у класифікації НЕН бронхо-легеневої локалізації, зокрема, у визначенні ступеня диференціювання пухлини за рівнем експресії Ki-67 [140, 189, 236], а також тим, що переважна більшість досліджень при НЕН легень проводиться на невеликих вибірках [85, 101, 151, 219].

У нашому дослідженні переважали агресивні низько диференційовані форми НЕН легень (56,6% випадків), причому частка SCLC майже вдвічі перевищувала таку при LCNEC, що практично збігається з даними інших авторів [6, 119, 127, 141, 232–234, 240, 242].

### 3.2. Гістологічна характеристика нейроендокринних новоутворень легень (за результатами дослідження архівного і клінічного матеріалу)

В цьому підрозділі представлені дані щодо морфологічних особливостей НЕН легень.

Досліджені нами зразки НЕН легень мали характерну органоїдну будову: «гнізда», «розетки», трабекули. У низько диференційованих зразках нерідко відзначався солідний тип росту, а також поширені некрози і крововиливи.

Чинна класифікація НЕН бронхо-легеневої локалізації має власні переваги та недоліки [64]. Диференціальна діагностика підтипів НЕН легень базується на 2 гістологічних параметрах: наявності / відсутності некрозів та кількості мітозів на  $2 \text{ мм}^2$ . Діагноз ТС встановлюють за відсутності в тканині пухлини вогнищ некрозу, при цьому кількість мітозів  $<2$  на  $2 \text{ мм}^2$ ; в АС зазвичай наявні дрібні вогнища некрозу, кількість мітозів — від 2 до 10 на  $2 \text{ мм}^2$ ; у високо злякисних низько диференційованих карциномах (LCNEC і SCLC)  $>10$  мітозів на  $2 \text{ мм}^2$ , множинні в протяжні вогнища некрозу. Фокальні некрози, як правило, не перевищують 20% площі зразка, великі — можуть перевищувати 50% площі зразка [110].

Для карциноїдів легень характерний органоїдний паттерн росту (з формуванням «розеток», «гнізд», псевдозалозистих, папілярних структур тощо) (рис. 3.2.1, 3.2.2). Пухлинні клітини зазвичай однотипні, полігональні (інколи веретеноподібні), з помірною кількістю цитоплазми; ядра округлі або овальні, з непримітними ядерцями, з характерним гранулярним типом хроматину («сіль та перець»). Групи ТС і АС були досить подібними за гістологічною картиною та ІГХ-характеристиками (крім вогнищ некрозу, кількості мітозів у полі зору та рівня експресії Ki-67).

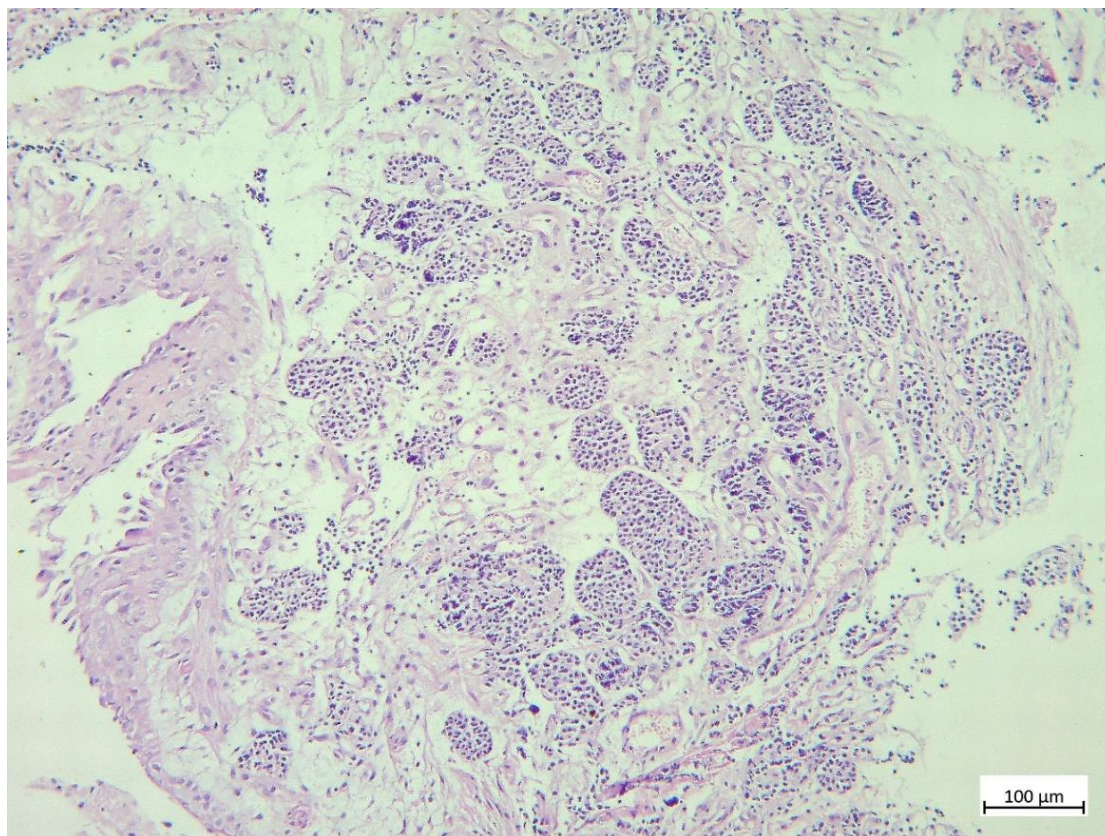


Рис. 3.2.1. Мікрофото. Пацієнт, 44 роки. ТС. T2aN0M0, стадія ІВ (Кі-67=2%). В стінці бронха новоутворення з мономорфних клітин, що формують альвеолярні структури. Некрози відсутні. Зб.×100, забарвлення гематоксиліном і еозином.

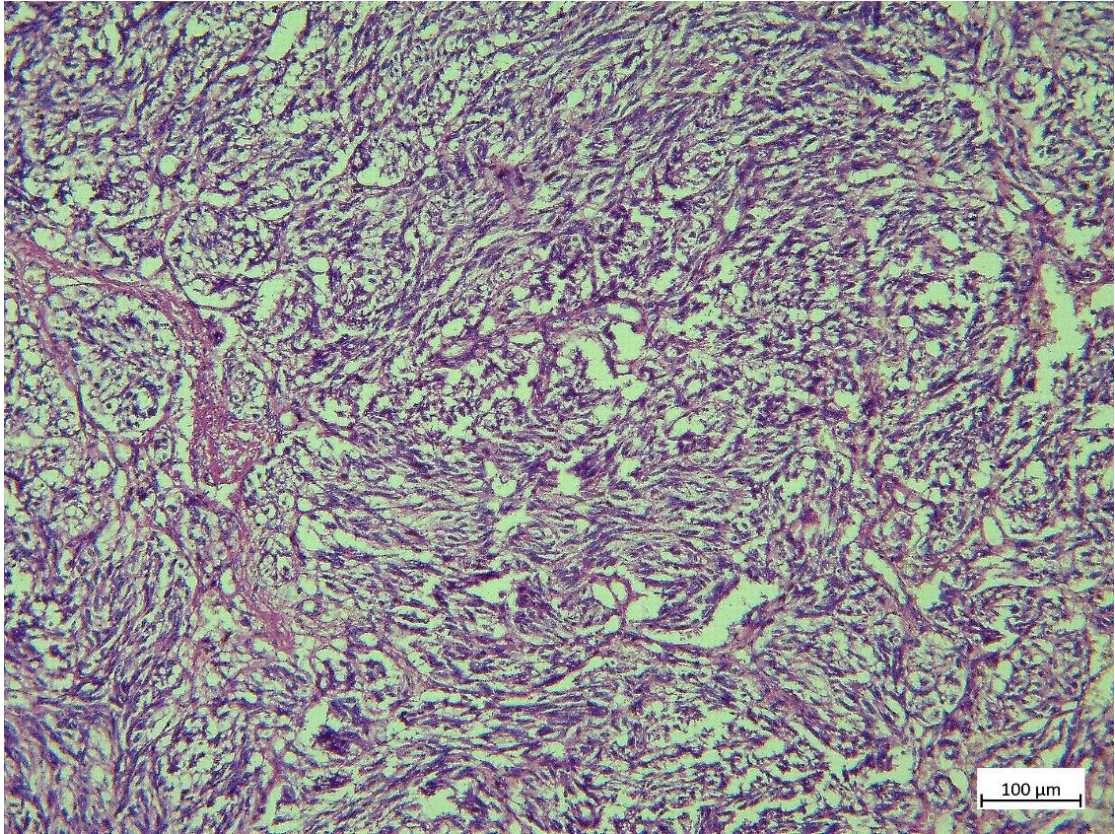


Рис. 3.2.2. Мікрофото. Пацієнтка, 34 роки. АС лівої легені з метастазами в лімфатичні вузли середостіння, голови та шиї, Т3N3M0, стадія ІІС (Ki-67=20%). Веретеноподібні клітини часто виявляють у НЕН легень, що метастазують; також для АС притаманні дрібні вогнища некрозу. Зб.×100, забарвлення гематоксиліном і еозином.

LCNEC склали 17,7% усіх спостережень і 31,25% низько диференційованих НЕН легень. Клітини таких НЕК крупні, світлі, з великими ядрами і чітко окресленими ядерцями; нерідко виявляли великі ділянки некрозу (рис. 3.2.3). Подекуди у LCNEC виявляли паттерни, характерні для аденокарциноми або плоскоклітинної карциноми, проте, їх площа була замалою ( $\leq 10\%$  зразка) для верифікації змішаних форм НЕК [80, 115, 132].

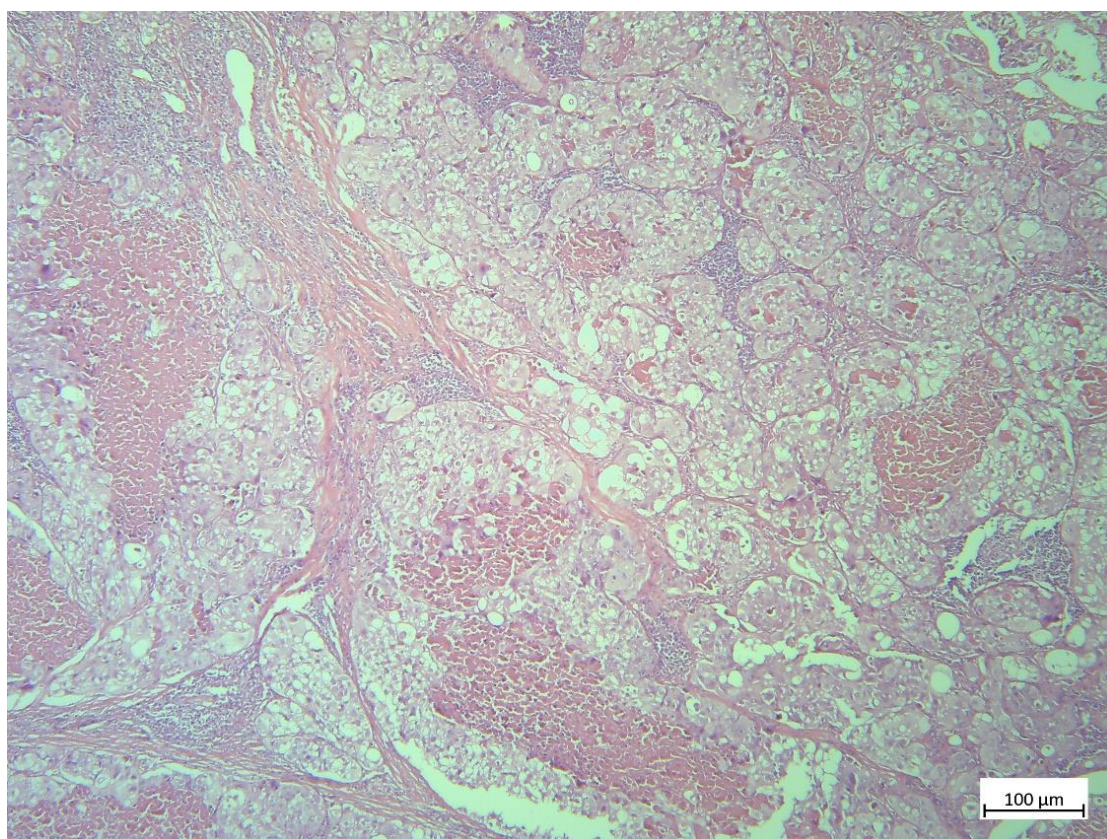


Рис. 3.2.3. Мікрофото. Пацієнт, 76 років. LCNEC правої легені з метастазами в лімфатичні вузли середостіння, надключичної ділянки справа, T2bN3M0, стадія ШВ (Ki-67=45%). Клітини новоутворення крупні, з великим ядром і світлою рясною цитоплазмою; виражена клітинна та ядерна атипія. Характерний органоїдний, солідно-альвеолярний патерн росту, численні вогнища некрозу, крововиливи. 36. $\times$ 100, забарвлення гематоксиліном і еозином.

SCLC — найбільш численна група — 38,9% всієї вибірки і 68,75% низько диференційованих НЕН бронхо-легеневої локалізації. Для SCLC характерним було формування розеткоподібних, трабекулярних і солідних структур. Клітини дрібні, з невеликою кількістю цитоплазми, містили ядра овоїдної або неправильної форми з гранулярним хроматином; ядерця не диференціювалися; виявляли каріопікноз, численні та протяжні вогнища некрозу й крововиливів (рис. 3.2.4–3.2.6).

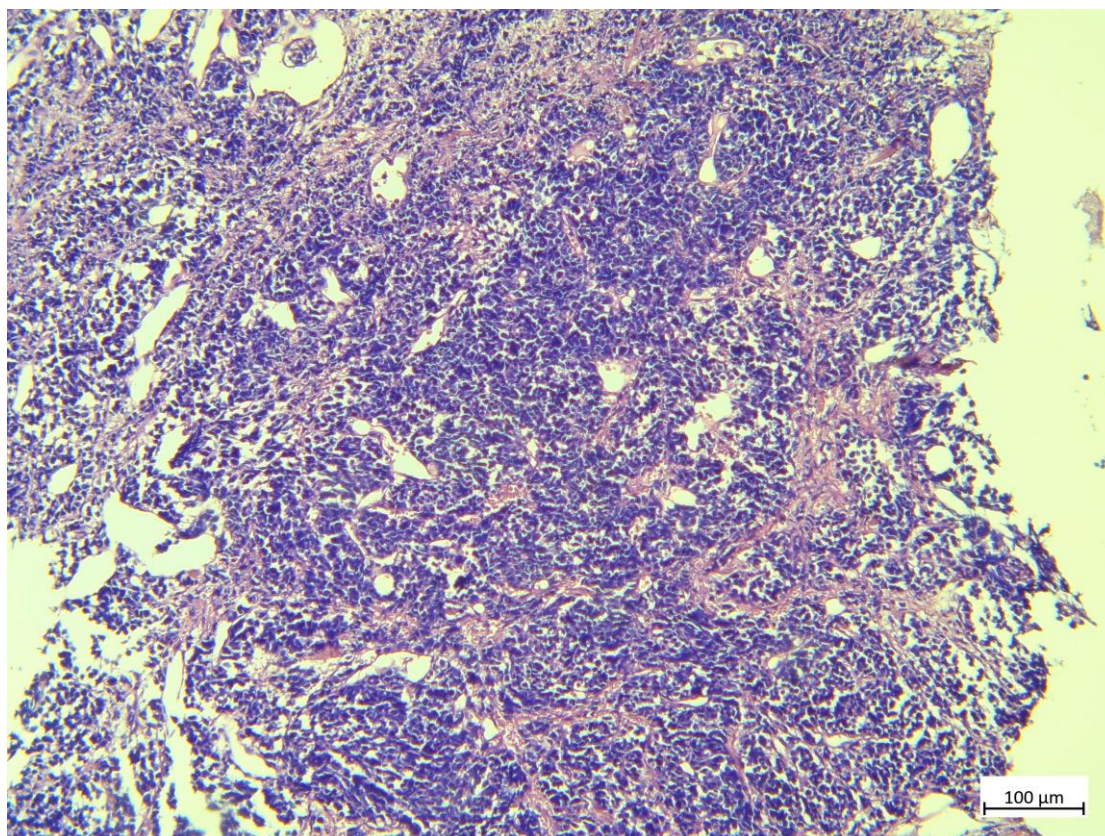


Рис. 3.2.4. Мікрофото. Пацієнтка, 63 роки. SCLC верхньої частки лівої легені. T2N3M1a, стадія IVA (Ki-67=80%). Новоутворення складається з дрібних клітин з мізерною цитоплазмою і гіперхромним ядром. Солідно-альвеолярний тип росту. В матеріалі біопсії визначали численні крупні вогнища некрозу (не потрапили на фото). Зб.×100, забарвлення гематоксиліном і еозином.



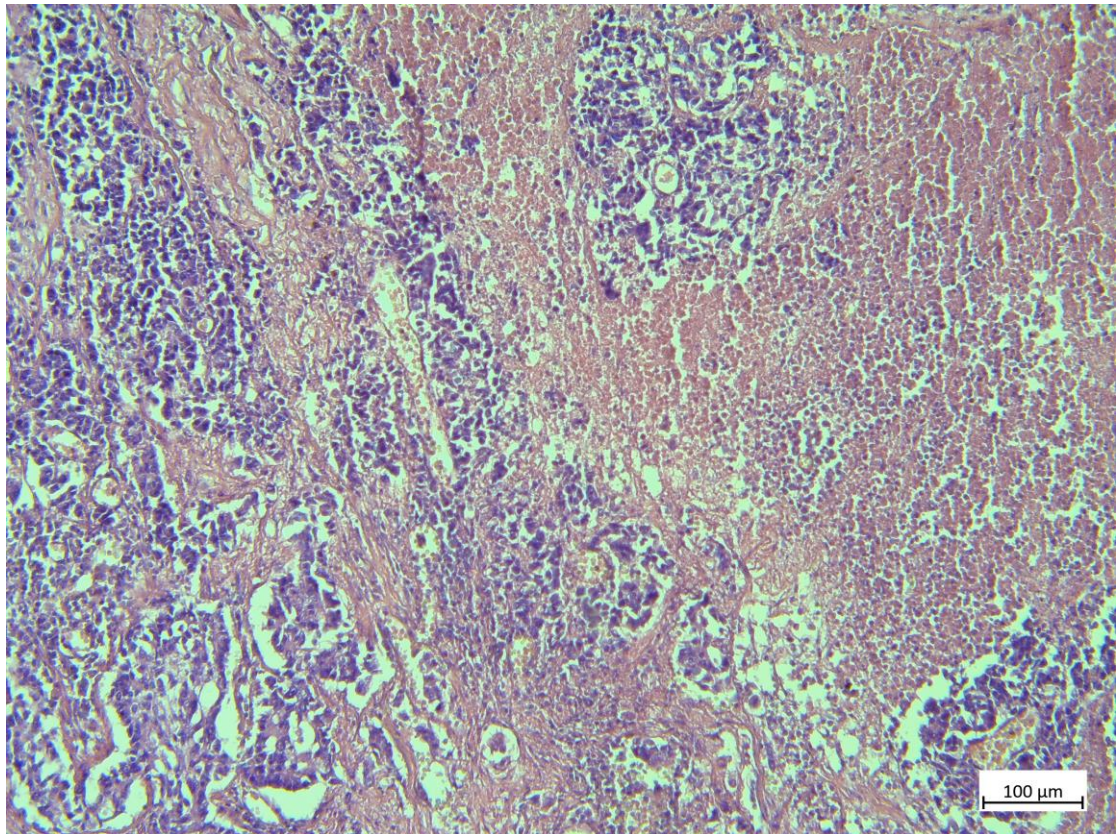


Рис. 3.2.5. Мікрофото. Пацієнт, 70 років. SCLC правої легені. T3N0M0, стадія ІІВ (Ki-67=95%). Матеріал краш-біопсії. Новоутворення складається з дрібних клітин з мізерною цитоплазмою і гіперхромним ядром. Виражена клітинна і ядерна атипія. Солідно-альвеолярний тип росту. Численні екстенсивні вогнища некрозу. 3б.×100, забарвлення гематоксиліном і еозином.

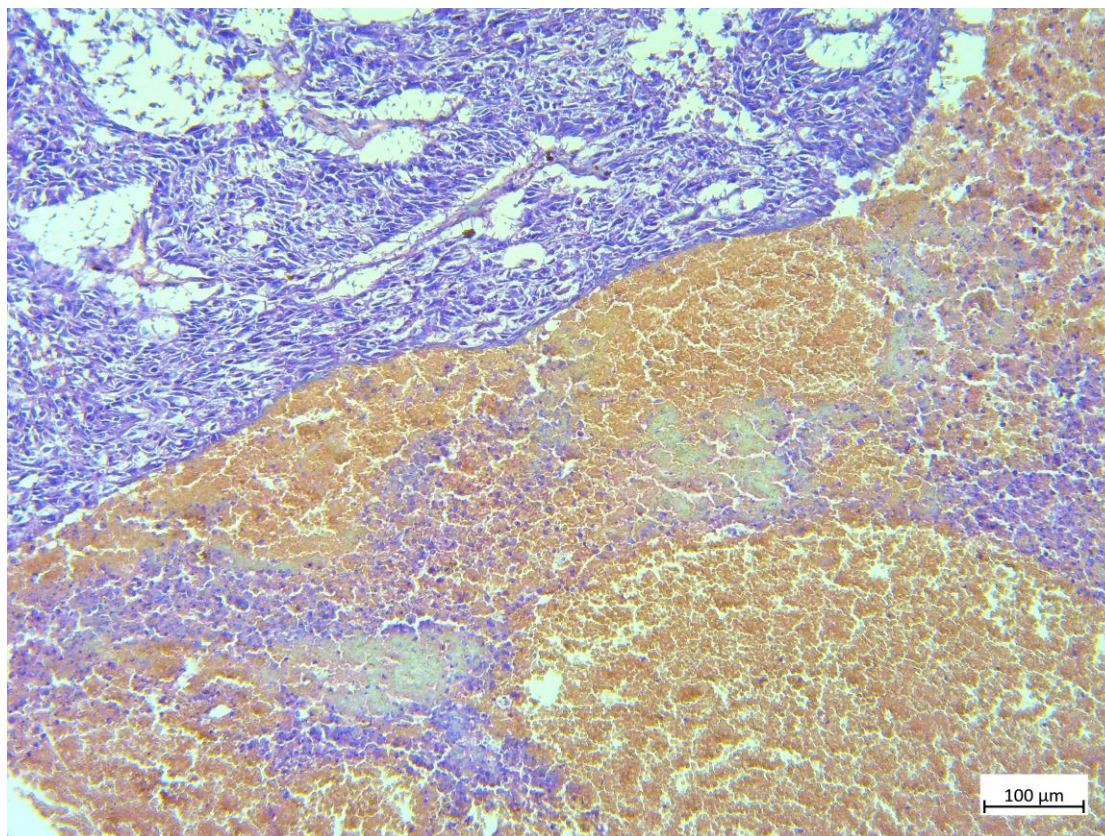


Рис. 3.2.6. Мікрофото. Пацієнт, 54 роки. SCLC нижньої частки правої легені. T4N2M1a, стадія IVA (Ki-67=65%). Дрібні пухлинні клітини з гіперхромним ядром і мізерною цитоплазмою утворюють характерні «розеткоподібні» структури; в тканині пухлини наявні численні вогнища некрозу та крововиливи. Зб.×100, забарвлення гематоксиліном і еозином.

Для низько диференційованих агресивних гістологічних варіантів НЕН легень (LCNEC і SCLC) характерне збільшення кількості мітозів, у тому числі патологічних їх форм (К-мітози, з розсіюванням хромосом), наявність спотворених багатоядерних клітин, виражена клітинна і ядерна атипія (рис. 3.2.7., 3.2.8).

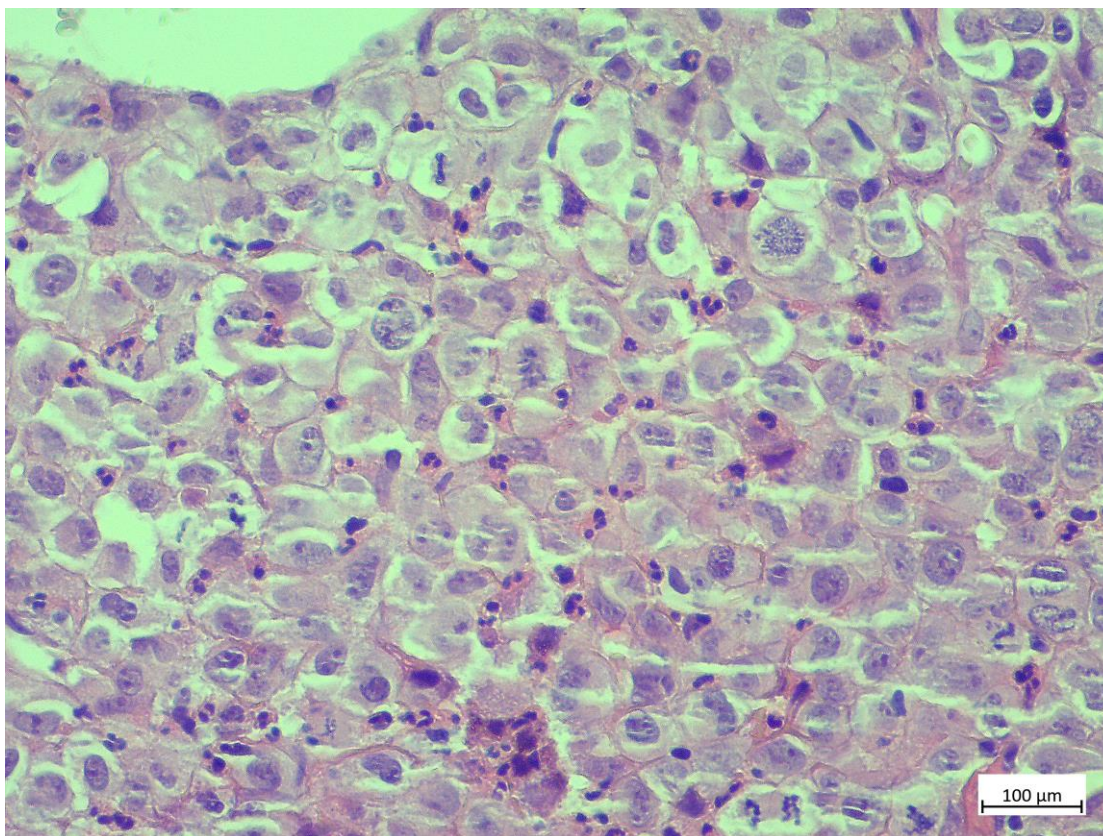


Рис. 3.2.7. Мікрофото. LCNEC. Тканина пухлини побудована з різко атипових клітин, солідно-альвеолярний тип росту. В препараті (не потрапили на фото) множинні, крупні вогнища некрозу та крововиливи. Клітини новоутворення крупні, округлі, з помірною / великою кількістю цитоплазми; ядра переважно світлі з добре помітним хроматиновим рисунком. В полі зору велика кількість мітозів, зокрема, К-мітозів і з розсіюванням хромосом, каріорексис. Зб.×200, забарвлення гематоксилином і еозином.

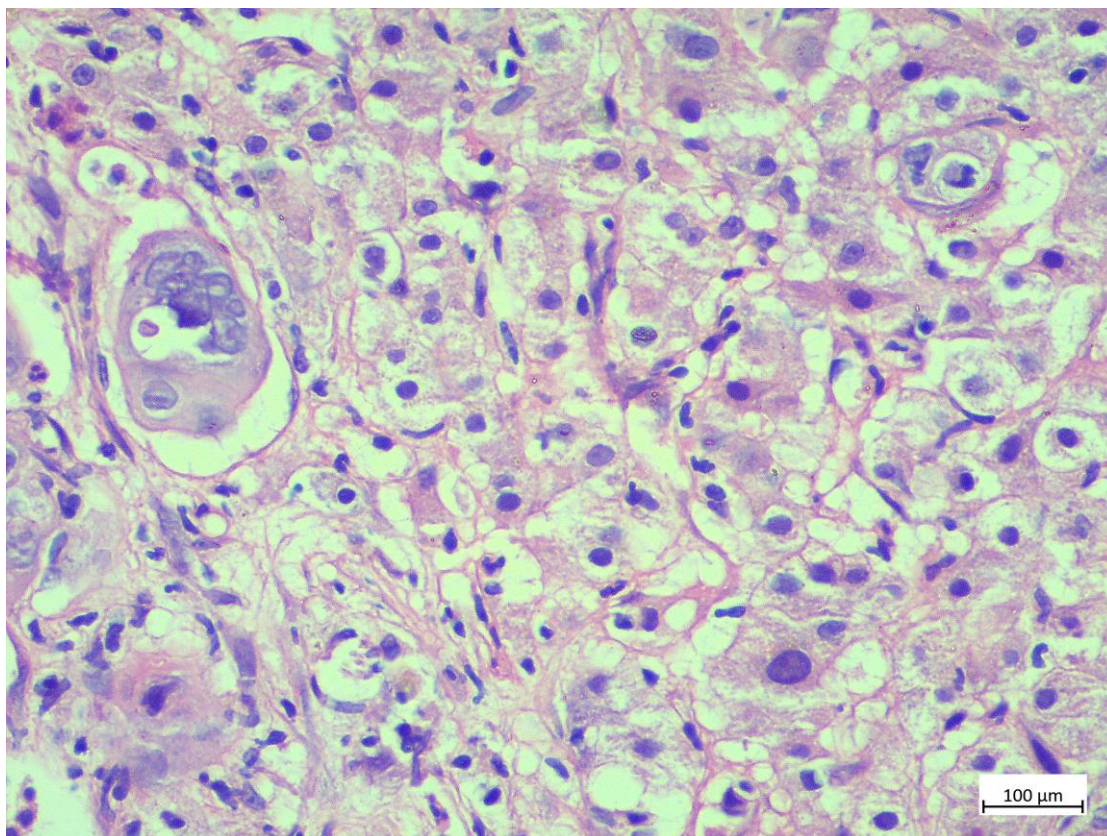


Рис. 3.2.8. Мікрофото. LCNEC. Тканина пухлини побудована з різко атипових клітин з переважно солідним типом росту. Дрібні вогнища некрозу. Патологічні мітози (К-мітози); в полі зору — велика багатоядерна атипова клітина. Зб.×200, забарвлення гематоксиліном і еозином.

При діагностиці НЕН необхідно одночасно враховувати морфологічні та ІГХ характеристики. Для верифікації НЕН легень корисною є «базова» панель ІГХ-маркерів: ChrA, Syn, CK7, TTF-1, CD56, Ki-67.

За даними літератури, LCNEC характерна часткова втрата експресії Syn і більш виражена — ChrA та TTF-1, суттєве збільшення проліферативної активності (порівняно з карциноїдами). При SCLC відзначають зниження експресії нейроендокринних маркерів і CK7; показник TTF-1 залишається майже на такому ж рівні, як і у LCNEC; індекс Ki-67 зростає [50, 57, 75, 137, 152, 164, 231].

Більш детально експресія основних ІГХ маркерів та їх кореляція з гістологічними особливостями НЕН легень описані у наступному підрозділі.

### **3.3. Кореляція між експресією імуногістохімічних маркерів і гістологічними характеристиками при нейроендокринних новоутвореннях легень**

Як уже зазначалося вище, ключовими для точної діагностики бронхо-легеневих НЕН є морфологічні ознаки: характерний «органоїдний» патерн росту (роzetки, трабекули, стрічки, гнізда, палісади); МІ та некрози відіграють важливу роль у грейдінгу та прогнозуванні [94, 159, 205].

Внаслідок «перекривання» морфологічних ознак при НЕН і НЕК легень, для підтвердження діагнозу конче необхідне ІГХ дослідження. Крім того, у деяких випадках низько диференційовані НЕН легень неможливо діагностувати лише за даними дослідження рутинних гістологічних слайдів (гематоксилін, еозин), особливо на матеріалі малих або краш-біопсій, що також вимагає застосування ІГХ. Також, за допомогою біомаркерів можна виключити гістологічну «мімікрію» (низько диференційовану плоскоклітинну карциному, гематологічні новоутворення тощо), особливо у випадках НЕК легень. ІГХ є потужним діагностичним засобом: її використовують для визначення нейроендокринного диференціювання пухлин (експресія нейроендокринних маркерів, крім NSE, найбільш інформативна панель — ChrA, Syn, CD56); локалізації первинного новоутворення (маркери TTF-1, CK7), а також його агресивності (оцінка індексу проліферації Ki-67) [75, 94, 107, 109, 110, 159, 241].

Ki-67 дуже затребуваний в онкологічній практиці для грейдінгу / прогнозування та планування лікування. Основна діагностична роль Ki-67 при НЕН легень полягає у розмежуванні карциноїдів і низько диференційованих НЕК, зокрема у малих / краш-біопсіях, за обмеженої кількості матеріалу для дослідження. Також Ki-67 дозволяє більш точно, ніж МІ, оцінити проліферацію пухлинних клітин, оскільки експресується у G1–S–G2 клітинного циклу і «висвічує» клітини без фігур мітозу [71, 90, 137]. Ki-67

необхідний для грейдінгу, оскільки ступінь злякисності є одним з основних драйверів прогнозу при НЕН легень [96].

Syn і ChrA — достовірні маркери нейроендокринного диференціювання, перший вважається більш чутливим, другий — більш специфічним. Syn асоційований з везикулами, подібними до синаптичних, ChrA — з ядерними щільними хромафінними гранулами [12]. Експресія нейроендокринних маркерів суттєво різниться у різних гістологічних підтипах НЕН легень. Зазвичай позитивними на ChrA є карциноїди і LCNEC, натомість SCLC рідко експресують цей маркер [73]. Така сама тенденція і з Syn. CD56 навпаки є найбільш чутливим для діагностики низько диференційованих НЕК, хоча 5–10% SCLC можуть бути негативними за всіма трьома нейроендокринними маркерами. Використання ІГХ панелі нейроендокринних маркерів дозволяє виявити навіть дуже незначне мембранне забарвлення на будь-який з них у зразках пухлин з відповідною морфологією [50, 75, 185, 241].

СК7 і TTF-1 є важливим інструментом диференційної діагностики НЕН легень і ШКТ. Чутливість цих маркерів посередня, але вони є високо специфічними для первинних пухлин бронхо-легеневої локалізації [23]. TTF-1 — фактично єдиний маркер первинних пухлин легень, він є корисним у випадку ТС і АС, але його експресію виявляють лише у 50% зразків, забарвлення зазвичай є фокальним і досить слабким. СК7 широко використовують для диференційної діагностики пухлин легень і кишечника (до 70% первинних новоутворень бронхо-легеневої локалізації є СК7-позитивними, пухлини кишечника навпаки, є СК7-негативними) [22, 158, 218, 241].

Всі спостереження пухлин легень з нейроендокринною морфологією обов'язково потребують ІГХ-дослідження для встановлення коректного діагнозу.

Наразі велика увага приділяється вивченню ІГХ-маркерів, однак, бракує інформації щодо кореляції між їх експресією та ключовими гістологічними

характеристиками НЕН легень (некрози, проліферативний індекс, ступінь злоякісності), а наявні дані часто є суперечливими.

У нашому дослідженні ми визначали рівень кореляції між експресією різних ІГХ-маркерів, індексом проліферації (Ki-67) і ступенем диференціювання НЕН легень.

Дослідження проведене у всіх 113 випадках, на матеріалі 36 резекцій і 77 біопсій, 42 (54,5%) з яких виявилися малими або подрібненими. Для визначення експресії біомаркерів нами використане моноклональні антитіла анти-Ki-67, клон MIB-1 (Dako, USA); анти-ChrA, клон SP12 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA); анти-Syn, клон DAK-SYNAP (Dako, Denmark); мишаче анти-людське антитіло CD56, клон 123C3 (Dako, Denmark); мишаче антитіло анти-TTF-1, клон 8G7G3/1 (Dako, Denmark); анти-людський СК7, клон OV-TL 12/30 (Dako, Denmark). В усіх випадках використані ChrA і Syn. За негативної або сумнівної експресії нейроендокринних маркерів додатково використаний маркер CD56 (у 18 (15.9%) зразках). TTF-1 і СК7 використані для підтвердження легеневого походження НЕН, особливо при метастазах з невідомого первинного вогнища.

Експресію Ki-67 визначали як відсоток пухлинних клітин з позитивним ядерним забарвленням. Для кожного зразка вибирали 5 полів зору мікроскопа при зб.  $\times 200$ , у кожному полі зору рахували 100 клітин пухлини для оцінки відсотка позитивно забарвлених проліферуючих клітин. Ki-67  $\leq 5\%$  відповідав Grade 1, 5–30% — Grade 2,  $>30\%$  — Grade 3 (IARC, 2021) [91]. Експресію решти ІГХ маркерів (TTF-1, СК7, ChrA, Syn, CD56) визначали за мембранним / цитоплазматичним забарвленням. Здійснена якісна оцінка ІГХ-реакції: від негативної / слабкої (+1) до сильної (+2), але наявність навіть найменшого забарвлення вважали позитивним результатом.

Вибірка була цензурованою. Для обробки результатів використані непараметричні методи статистики. Метод рангової кореляції Спірмена використаний для оцінки зв'язків між експресією ІГХ-маркерів, некрозом, індексом проліферації Ki-67 і ступенем диференціювання пухлини.

Основні характеристики вибірки представлені в табл. 3.3.1.

Табл. 3.3.1. Основні характеристики вибірки

Показники		НЕН легень (113 спостережень)			
		NETs		NECs	
		Grade 1	Grade 2	Grade 3	
		TC	AC	LCNEC	SCLC
Кількість випадків		9 (8,0%)	40 (35,4%)	20 (17,7%)	44 (38,9%)
Стать пацієнтів: чоловіки / жінки		6 / 3	29 / 11	17 / 3	39 / 5
Вік хворих, роки		56,8 ДІ 95% (46,1– 67,5)	53,4 ДІ 95% (48,8– 58,1)	62,7 ДІ 95% (59,7– 65,8)	63,2 СІ 95% (60,7– 65,7)
Вогнища некрозу (кількість випадків)	відсутні	7 (77,8%)	15 (37,5%)	3 (15,0%)	8 (18,2%)
	фокальні	2 (22,2%)	9 (22,5%)	8 (40,0%)	11 (25,0%)
	екстенсивні	—	16 (20,4%)	9 (45,0%)	25 (56,8%)
Ki-67, %		4,1 ДІ 95% (3,3–4,9)	15,8 ДІ 95% (14,1– 17,4)	54,4 ДІ 95% (45,5– 63,2)	63,4 СІ 95% (58,5– 68,2)
Експресія основних ІГХ- маркерів	TTF-1	7 (77,8%)	21 (52,5%)	9 (45,0%)	19 (43,2%)
	CK7	5 (55,6%)	27 (67,5%)	14 (70,0%)	24 (54,5%)
	ChrA	9 (100,0%)	34 (85,0%)	13 (65,0%)	27 (61,4%)
	Syn	8 (88,9%)	31 (77,5%)	15 (75,0%)	32 (72,7%)

Наймолодший пацієнт — жінка 19 років з діагнозом AC, найстарший — чоловік 77 років з діагнозом SCLC. У групі TC вік пацієнтів від 30 до 74 років, AC — від 19 до 76 років, LCNEC — від 48 до 73 років, SCLC — від 38 до 77 років. В групі AC 9 хворих були молодші 40 років, 4 (44%) з них були жіночої статі.

У більшості спостережень виявлена характерна для НЕН легень архітектоніка: органоїдний тип росту, «гнізда», трабекули і розетки; всі зразки експресували 2 нейроендокринні ІГХ-маркери або принаймні 1.

Лише в кількох зразках TC виявлені дрібні вогнища некрозу. У тканині помірно і низько диференційованих НЕН легень спостерігали більшу кількість вогнищ некрозу, які ставали більш протяжними.



У нашому дослідженні рівень експресії Ki-67 коливався від 2 до 5% при TC (Grade 1), від 6 до 25% — при AC (Grade 2), і від 30 до 100% при LCNEC і SCLC (Grade 3). У міру зменшення ступеня диференціювання пухлини рівень експресії Ki-67 прогресивно збільшувався.

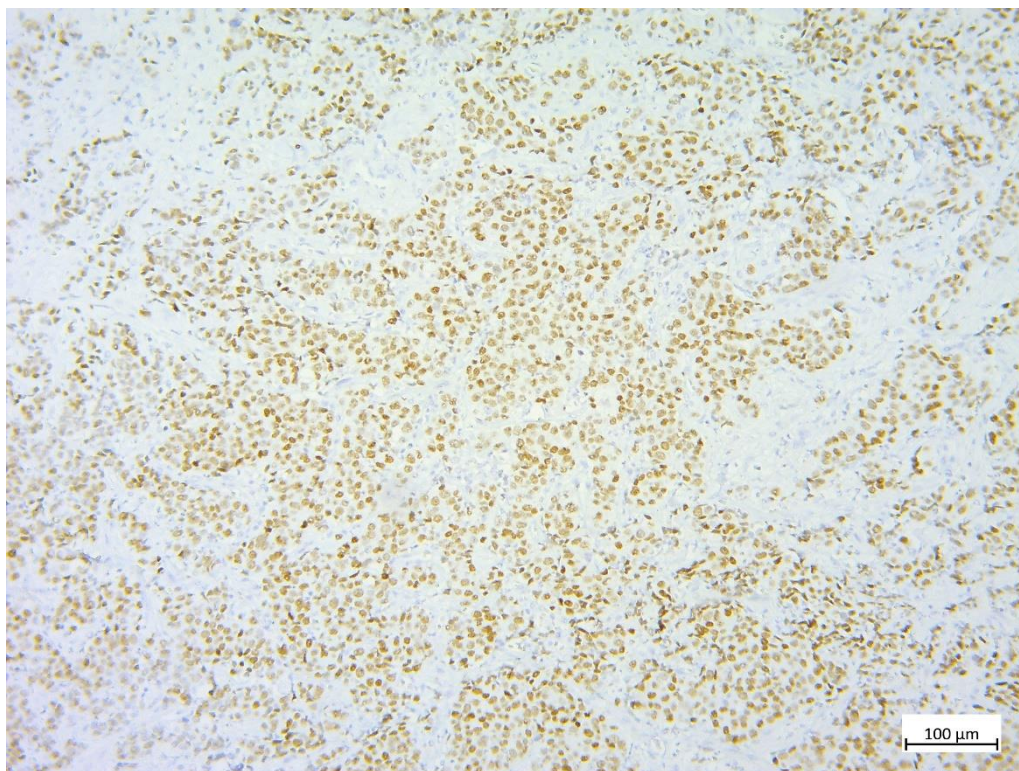
56 (49,6%) зразків виявилися TTF-1-позитивними: у 21 (18,6%) випадку забарвлення було слабким, у 35 (31,0%) — помірним або вираженим.

70 (61,9%) зразків були позитивними на CK7: у 12 (10,6%) спостереженнях результат реакції оцінений як слабкий, у 58 (51,3%) — як помірний або виражений.

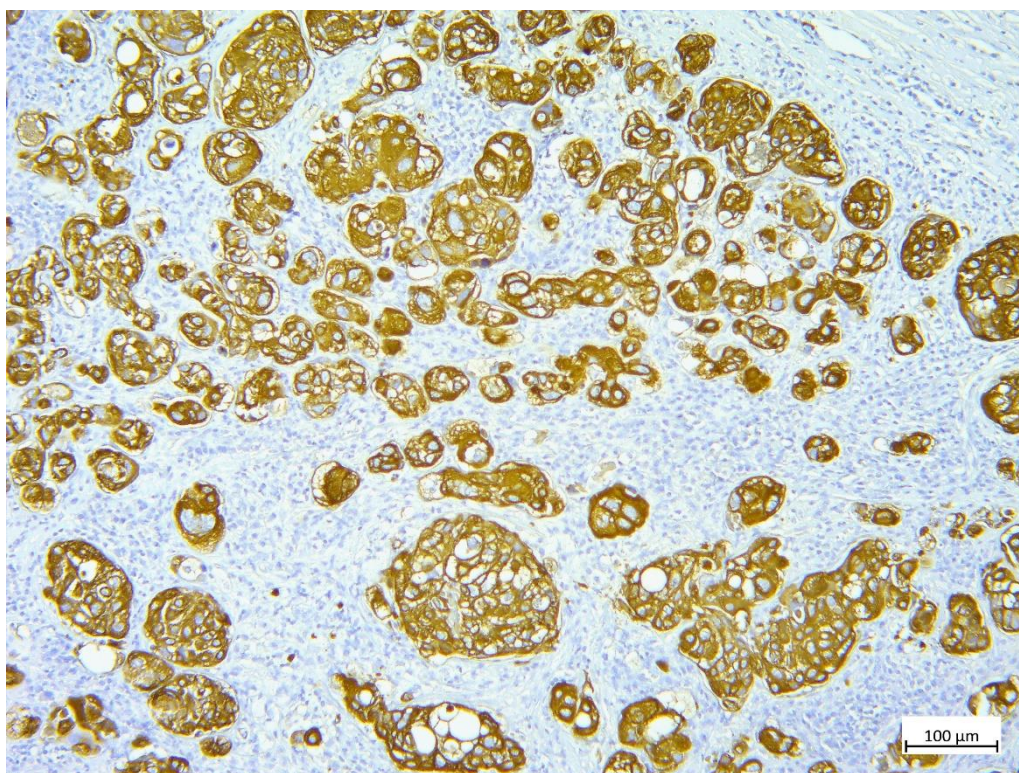
На ChrA позитивними були 83 (73,5%) зразків НЕН легень, на Syn — 86 (76,1%). Слабка експресія ChrA виявлена у 19 (16,8%) зразках, Syn — у 14 (12,4%). Помірну або виражену експресію ChrA відзначали у 64 (56,6%) випадках, Syn — у 72 (63,7%). 24 (37,5%) низько диференційованих НЕН легень були ChrA-негативними, 17 (26,6%) — Syn-негативними, 7 (10,9%) НЕК були негативними за обома зазначеними маркерами. Експресія ChrA знижувалася і досить швидко зникала у міру прогресії пухлини, однак деякі низько диференційовані НЕК залишалися ChrA-позитивними.

Маркер CD56 використаний у 18 (15,9%) зразках НЕН легень, у яких експресія ChrA і Syn була негативною або сумнівною (зокрема, йдеться про матеріал малих і краш-біопсій). Всі ці випадки виявилися CD56-позитивними, хоча 7 (38,9%) пухлин (6 SCLC і 1 LCNEC) були і ChrA-, і Syn-негативними.

Мікрофото ІГХ-реакцій представлені на рис. 3.3.1 (А–Е).

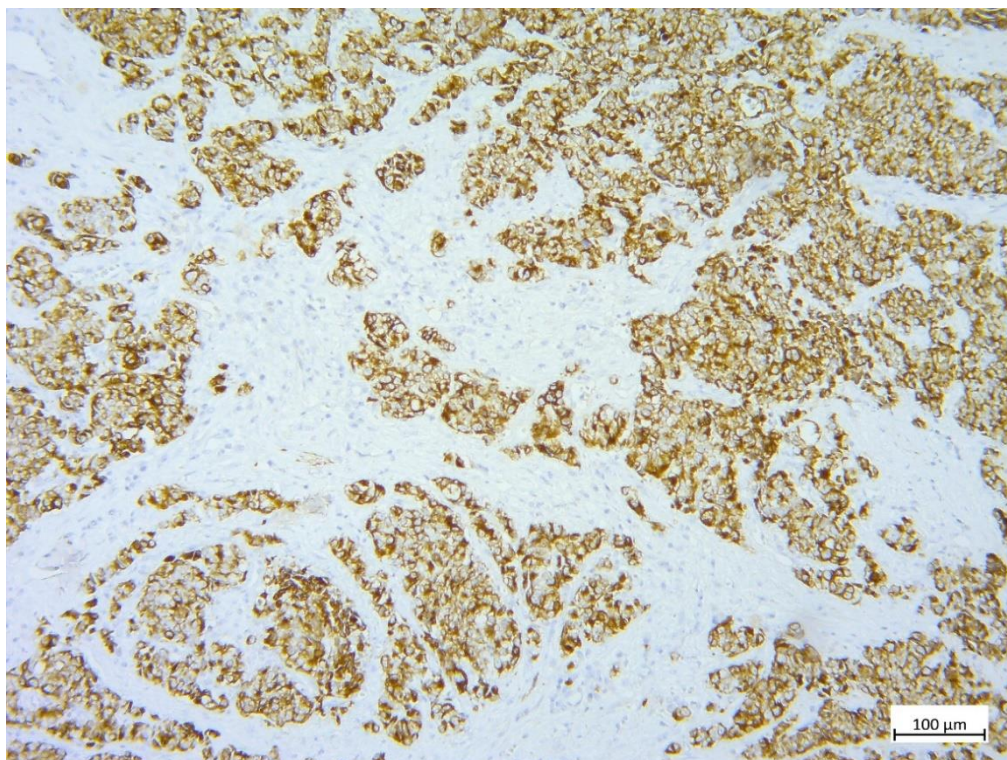


А

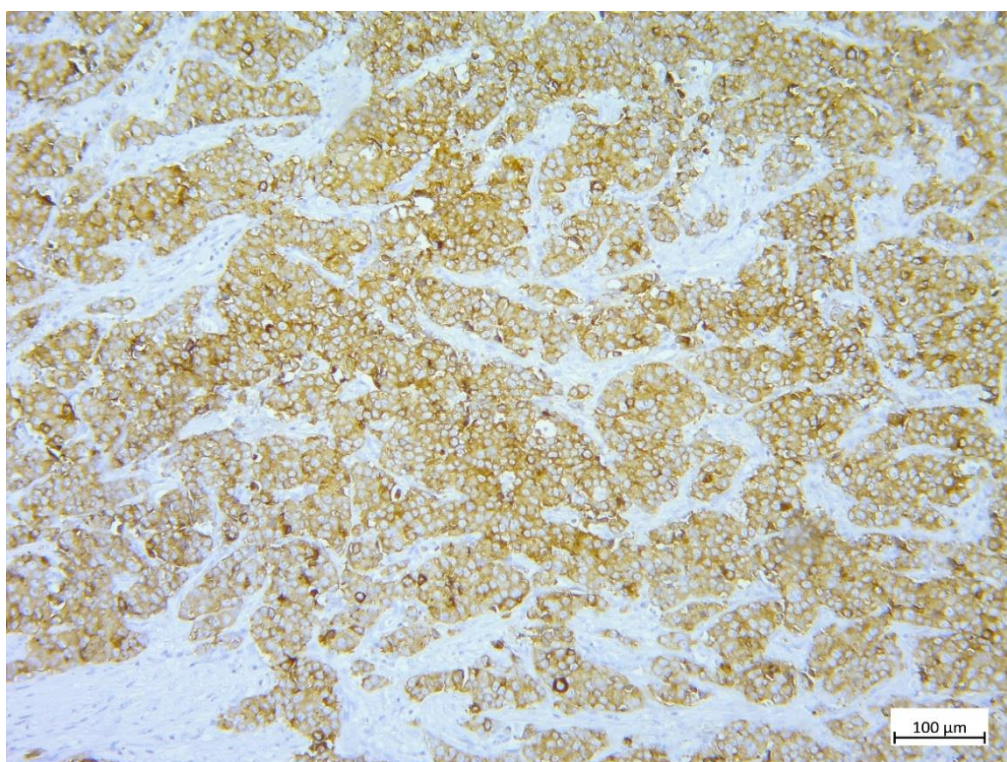


Б

Рис. 3.3.1. Мікрофото. ІГХ-дослідження. Виражена позитивна реакція з характерними ІГХ-маркерами в тканині НЕН легень. А — АС (Grade 2), ТТФ-1 позитивна реакція на ТТФ-1 (2+). Б — АС (Grade 2), позитивна реакція на СК7 (2+). 36.×100.

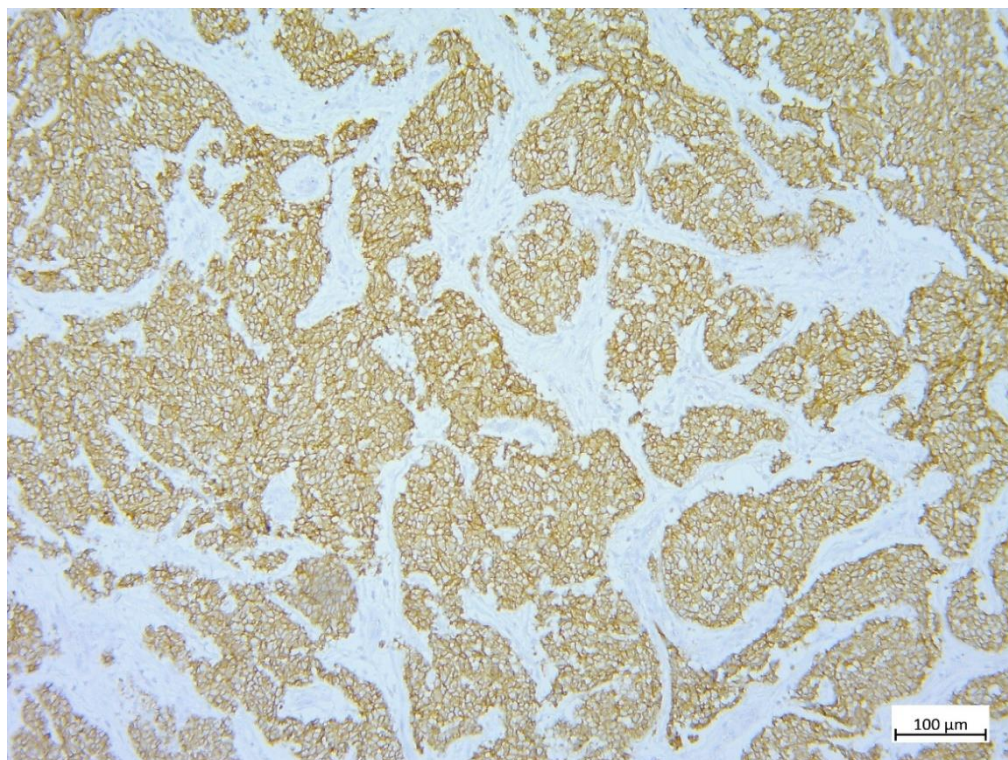


В

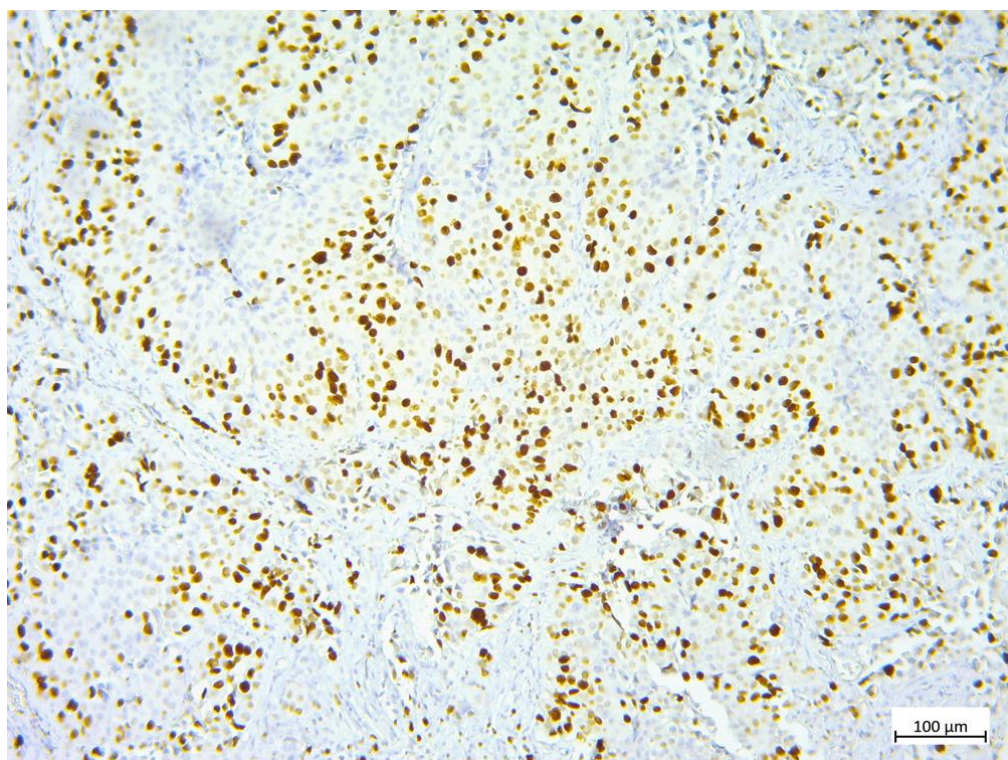


Г

Рис. 3.3.1. Мікрофото. ІГХ-дослідження. Виражена позитивна реакція з характерними ІГХ-маркерами в тканині НЕН легень. В — АС (Grade 2), позитивна реакція на ChrA (2+); Г — АС (Grade 2), позитивна реакція на Syn (2+). 36.×100.



Д



Е

Рис. 3.3.1. Мікрофото. ІГХ-дослідження. Виражена позитивна реакція з характерними ІГХ-маркерами в тканині НЕН легень. В — SCLC (Grade 3), позитивна реакція на CD56 (2+); Г — LCNEC (Grade 3), Ki-67 = 55%. 36.×100.

Виявлена сильна кореляція між експресією ChrA та інших ІГХ-маркерів, зокрема, рівнем проліферативної активності (Ki-67), а також між експресією ChrA і наявністю і поширеністю вогнищ некрозу, і ступенем злякисності НЕН легень.

Позитивна реакція на ChrA корелювала з ІГХ-маркерами, які переважно еспресуються у високо і помірно диференційованих первинних НЕН легень. Виявлений сильний кореляційний зв'язок між експресією ChrA, позитивною реакцією на TTF-1 і СК7 (рангова кореляція Спірмена,  $\rho=0,287$ ,  $\rho=0,00852$  та  $\rho=0,254$ ,  $\rho=0,00147$  відповідно). Також виявлена рівні експресії TTF-1 і СК7 корелювали між собою (рангова кореляція Спірмена,  $\rho=0,201$ ,  $\rho=0,00000352$ ).

Виявлена сильна негативна кореляція між позитивною реакцією на ChrA і наявністю і поширеністю вогнищ некрозу (рангова кореляція Спірмена,  $\rho= -0,228$ ,  $\rho=0,0193$  та  $\rho= -0,366$ ,  $\rho=0,000121$  відповідно).

Також нами виявлена сильна негативна кореляція між експресією ChrA та індексом проліферації клітин пухлини (рівень експресії Ki-67) (рангова кореляція Спірмена,  $\rho= -0,363$ ,  $\rho=0,0000896$ ).

Також виявлена сильна негативна кореляція між експресією ChrA і ступенем диференціювання (Garde) НЕН легень (рангова кореляція Спірмена,  $\rho= -0,356$ ,  $\rho=0,000128$ ).

Решта виявлених і протестованих варіантів, для інших ІГХ-маркерів були статистично недостовірними.

Отже, у нашому дослідженні виявлено сильний позитивний кореляційний зв'язок між експресією ChrA і маркерами злякисних новоутворень первинної легеневої локалізації TTF-1 і СК. Всі ці три маркери експресуються переважно у високо і помірно диференційованих НЕН бронхо-легеневої локалізації (особливо це стосується ChrA та TTF-1).

Також виявлений сильний негативний зв'язок між експресією ChrA і некрозом, індексом проліферації (Ki-67) і ступенем диференціювання НЕН легень.

Експресія ChrA може бути використана як додатковий інструмент грейдінгу НЕН легень. Зниження або зникнення експресії ChrA є достовірним індикатором прогресії пухлини.

### **3.4. Прогностична цінність морфологічних особливостей та проліферативних маркерів (мітотичного індексу, Ki-67, PNH3)**

Некроз є одним з базових гістологічних критеріїв грейдінгу НЕН легень. Його виникнення в тканині пухлини є наслідком хронічної клітинної гіпоксії. Обидва ці фактори (гіпоксія та некрози) в деяких пухлинах корелюють з поганим прогнозом. Великі некрози (які часто виявляють у LCNEC і SCLC), свідчать про агресивний фенотип новоутворення, однак, прогностична цінність цього явища у більшості випадків нез'ясована [205, 207].

Пошук надійних прогностичних факторів для оцінки поведінки НЕН легень є дуже важливим. І ймовірно, що більшість з них пов'язані з проліферацією клітин пухлини [159, 170]. Цей показник є дуже важливим інструментом оцінки біологічних характеристик новоутворення. Однак, незважаючи на велику кількість публікацій, оцінка проліферації недостатньо впроваджена у повсякденну практику [35]. Кінетика проліферації клітин залежить від типу / підтипу новоутворення, тривалості клітинного циклу, частки клітин, що проліферують тощо [173]. Використання різних методів для оцінки проліферації також сприяє певній плутанині. Однак, деяким дослідникам вдалося показати достовірну прогностичну цінність мітотичного індексу (МІ), а також ПХ-маркерів проліферації (зокрема, Ki-67, PNH3 та ін.) [99, 103, 149, 228].

МІ вважають одним з основних факторів визначення ступеня злоякісності різних новоутворень [134, 217]. Однак він має певні обмеження через гетерогенність самих пухлин та використання різних методів

підрахунку. Також апоптотичні тільця або зруйновані клітини можуть бути помилково сприйняті за К-мітози, що позначається на результатах дослідження [29, 56]. До того ж, результати підрахунку мітозів є досить суб'єктивними, саме дослідження вимагає багато часу [112].

Ki-67 — потужний інструмент для простого та швидкого виявлення проліферуючих пухлинних клітин [12]. Його вважають «золотим стандартом» ІГХ та використовується для оцінки агресивності новоутворення [56, 71, 130]. Однак, рівні експресії цього маркера «перекриваються» у різних підтипах пухлин [130, 157].

МІ і Ki-67 характеризують різні фази клітинного циклу, бракує стандартизованої методології, існують розбіжності в результатах при оцінці різними дослідниками. Незважаючи на всі ці недоліки, численні дослідження показали хорошу кореляцію між Ki-67 та МІ у багатьох новоутвореннях [102, 235]. Крім того, за даними деяких досліджень, МІ може бути використаний в якості прогностичного чинника, наприклад, у бронхо-легеневих НЕН, асоційованих з метастатичним ураженням [82, 99, 134].

Фосфогістон-3 (РННЗ) — відносно новий ІГХ-маркер, який використовують для об'єктивізації оцінки мітотичної активності у різних пухлинах. Він дозволяє виявити мітози, які легко пропустити при звичайному підрахунку мітозів, до того ж його вважають більш надійним і відтворюваним, ніж Ki-67 [53, 89, 213]. РННЗ може бути корисним в оцінці проліферації клітин новоутворення, при цьому відзначається висока узгодженість між різними дослідниками, методика вимагає набагато менше часу, ніж звичайний підрахунок мітозів на препаратах, забарвлених гематоксиліном і еозином [93, 149, 228].

У різних злоякісних пухлинах, ІГХ-маркер РННЗ продемонстрував свою надійність щодо виявлення мітозів [221, 227]. У деяких дослідженнях наголошувалося, що РННЗ може бути використаний як предиктор метастатичного ураження [149] та виживаності хворих [221].

Вважається, що грейд пухлини можна більш точно оцінити за допомогою РННЗ, проте, це збільшить кількість виявлених висок злоякісних новоутворень [221].

У різних пухлинах діагностична та прогностична цінність мітотичного індексу, Ki-67 і РННЗ суттєво варіюють [213]. Дані щодо діагностичної та прогностичної цінності РННЗ у НЕН значно обмежені [53].

З урахуванням суперечливості даних літератури, у нашому дослідженні ми перевіряли достовірність кореляції проліферації клітин пухлини, визначеної за допомогою МІ та інших маркерів проліферації (Ki-67 і РННЗ), та на підставі отриманих даних оцінювали агресивність НЕН легень.

Для дослідження рандомно були обрані гістологічні блоки з 64 випадків. Основну увагу приділяли оцінці вогнищ некрозу, МІ, експресії Ki-67 (клон МІВ-1, Dako, США) і РННЗ (кролячий поліклональний РННЗ, Diagnostic Biosystems, США).. Всі дані морфологічного та ІГХ-дослідження оцінювали два незалежні патологи, не будучи ознайомленими з історією хвороби пацієнта. Записи з історій хвороби та медичних карток використовували для оцінки клінічних знахідок і виживаності пацієнтів.

Параметри мітотичного індексу, Ki-67, РННЗ оцінювали за допомогою методів непараметричної статистики (критерій Манна-Уїтні, критерій кореляції Спірмена). 95% довірчий інтервал вирахований за допомогою адаптованого методу Вальда. Для оцінки виживаності використані критерій Каплан-Мейєра та логранк тест).

Вік пацієнтів від 29 до 76 років, співвідношення чоловіків і жінок 3,92:1. Віком 18–44 років було 7 (10,94%) пацієнтів (5Ч/2Ж); віком 45–59 років — 19 (29,69) хворих (13Ч/6Ж); віком 60–74 років — 37 (57,81%) (32Ч/5Ж). Лише 1 пацієнт був старше 75 років.

Вибірка була цензурованою. Період спостереження суттєво варіював — від 11 діб до 7,11 років, в середньому спостереження тривало 8,9 міс. Наслідки



не вдалося простежити у 15 (23%) випадках. 17 (26,56%) хворих померли, тривалість їх життя після встановлення діагнозу склала у середньому 12,2 міс. на момент завершення спостереження, 32 (50%) пацієнтів були живі, у цьому випадку період спостереження також суттєво варіював і складав у середньому 7,1 міс.

НЕН Grade 2 виявлені у 22 (34,38%) випадків, Grade 3 — у 41 (64,06%). У АС у середньому виявлені 7,86 мітозів у 10 полях зору, у НЕК — 22,12. Рівень експресії Ki-67 у АС становив в середньому 12,09%, у низько диференційованих НЕН — 50,24%; РННЗ становив 10,36% і 12,34% відповідно.

На момент встановлення діагнозу метастази у лімфатичні вузли виявлені у 68,18% пацієнтів при НЕП легень Grade 2 і у 87,80% — при НЕП Grade 3; віддалені метастази були наявні у 31,82% і 46,34% спостережень відповідно. У 31,82% зразках НЕП Grade 2 некрози не виявлені, у 36,36% — були наявні невеликі вогнища некрозу, у 31,32% — великі. Вогнища некрозу не виявлені у 19,51% зразках НЕП легень Grade 3, при цьому дрібні некрози відзначали у 29,27% пухлин, великі вогнища некрозу — у 51,22%.

МІ суттєво варіював: від 1 до 81 мітозів у НЕН Grade 2 і від 1 до 114 — у НЕН Grade 3. В той же час, МІ у АС був значно нижчим, ніж у низько диференційованих НЕК (7,86 і 22,12 відповідно). У деяких випадках було досить складно диференціювати К-мітози і апоптотичні тіла, що утруднювало визначення МІ.

Рівень експресії Ki-67 коливався від 2 до 100%. Рівень експресії Ki-67  $\leq 3\%$  виявлений лише в 1 (2%) зразку пухлини (T2N0M0); Ki-67 становив 5–30% у 22 (34,38%) зразках, Ki-67  $\geq 30\%$  — у 41 (64,06%) випадках. Вогнища некрозу виявлені у 75% зразках пухлин, у 43,75% — екстенсивні. Згідно критерію Манна-Уїтні, різниця між цими групами  $p=0,02$ . Отже, Ki-67 може бути відображенням ступеня злоякісності пухлини, одна лише цього критерію недостатньо для достовірного грейдингу НЕН. Класифікація, яку

використовують для діагностики НЕП легень, враховує характеристики вогнищ некрозу та рівень експресії Ki-67. Зазвичай у пухлинах Grade 2 виявляють кілька дрібних вогнищ некрозу, у Grade 3 — вогнища некрозу можуть мати велику площу, часто виявляють крововиливи. У нашому дослідженні Ki-67 не був достовірно пов'язаний з вираженістю некрозу (тест кореляції Спірмена,  $p=0,078$  — при порівнянні трьох груп зразків (без некрозів, з фокальними некрозами, з великими вогнищами некрозу); тест Манна-Уїтні,  $p=0,316$  — при порівнянні двох груп (з фокальними і великими некрозами)).

Дані експресії РННЗ та її оцінки виявилися суперечливими. Експресія РННЗ виявилася нижчою, ніж очікувалося і не перевищувала ні рівень експресії Ki-67, ані МІ (рис. 3.4.1., 3.4.2).

Виявлений статистично достовірний прямий зв'язок між рівнем експресії Ki-67 і МІ (коефіцієнт кореляції Спірмена  $\rho=0,441$ ,  $p<0,001$ ), а також між МІ та рівнем експресії РННЗ ( $\rho=0,620$ ,  $p<0,001$ ). Однак, статистично достовірний зв'язок між рівнем експресії Ki-67 і РННЗ відсутній ( $p=0,217$ ), рис. 3.4.3.

Не виявлено статистично достовірної залежності між МІ і наявністю некрозів (тест Манна-Уїтні,  $p=0,504$ ) та їх вираженістю (коефіцієнт кореляції Спірмена,  $p=0,148$ ). Однак виявилось, що МІ статистично достовірно пов'язаний з наявністю метастазів у лімфатичних вузлах (тест Манна-Уїтні,  $p=0,003$ ) і віддалених метастазів (тест Манна-Уїтні,  $p=0,029$ ), рис. 3.4.4. За наявності 0–6 мітозів у 10 полях зору вірогідність метастатичного ураження лімфатичних вузлів становила 62% (95% ДІ: 42–78%); при  $\geq 7$  мітозів у 10 полях зору — 97% (95% ДІ: 83–99%); при  $\geq 15$  мітозів у 10 полях зору — сягала 100% (95% ДІ: 87–100%). Вірогідність наявності у хворого віддалених метастазів становила 32% при  $\leq 10$  мітозів у 10 полях зору (95% ДІ: 54–83%); при  $\geq 10$  мітозів у 10 полях зору складала 59% (95% ДІ: 41–75%); а при  $\geq 40$

мітозі у 10 полях зору — сягала 86% (95% ДІ: 47–99%). Хоча, МІ достовірно не впливав на виживаність хворих ( $p=0,062$ ).

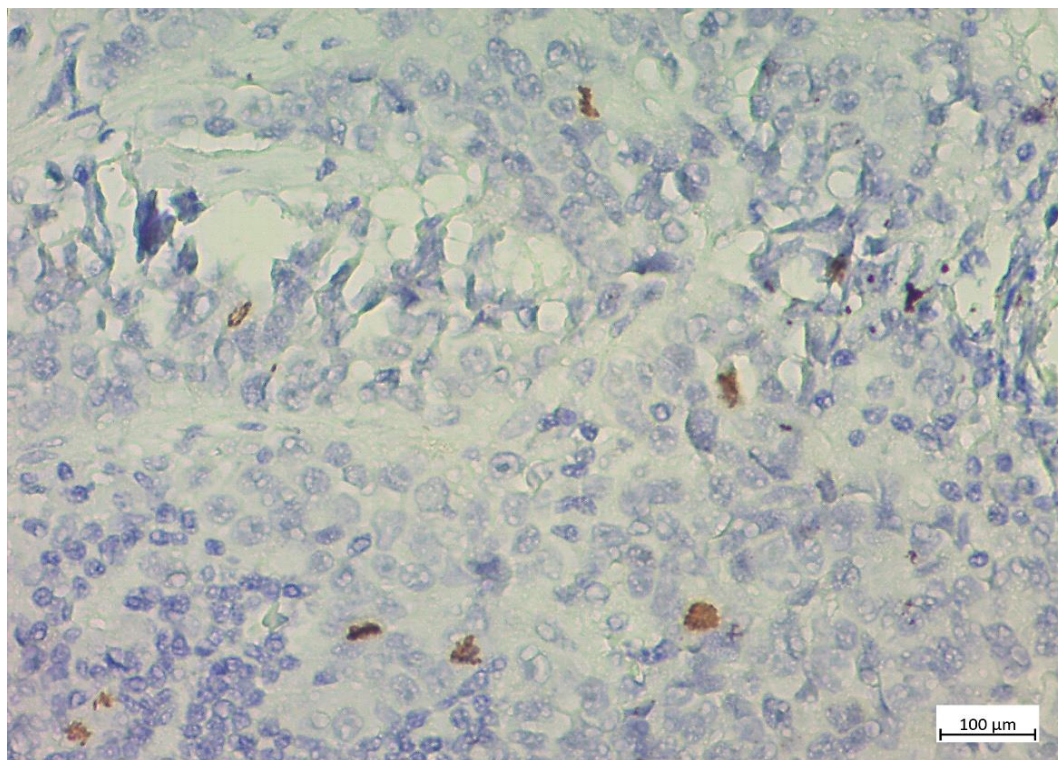


Рис. 3.4.1. Мікрофото. ІГХ-дослідження. Експресія РННЗ у зразку LCNEC, 36.×200.

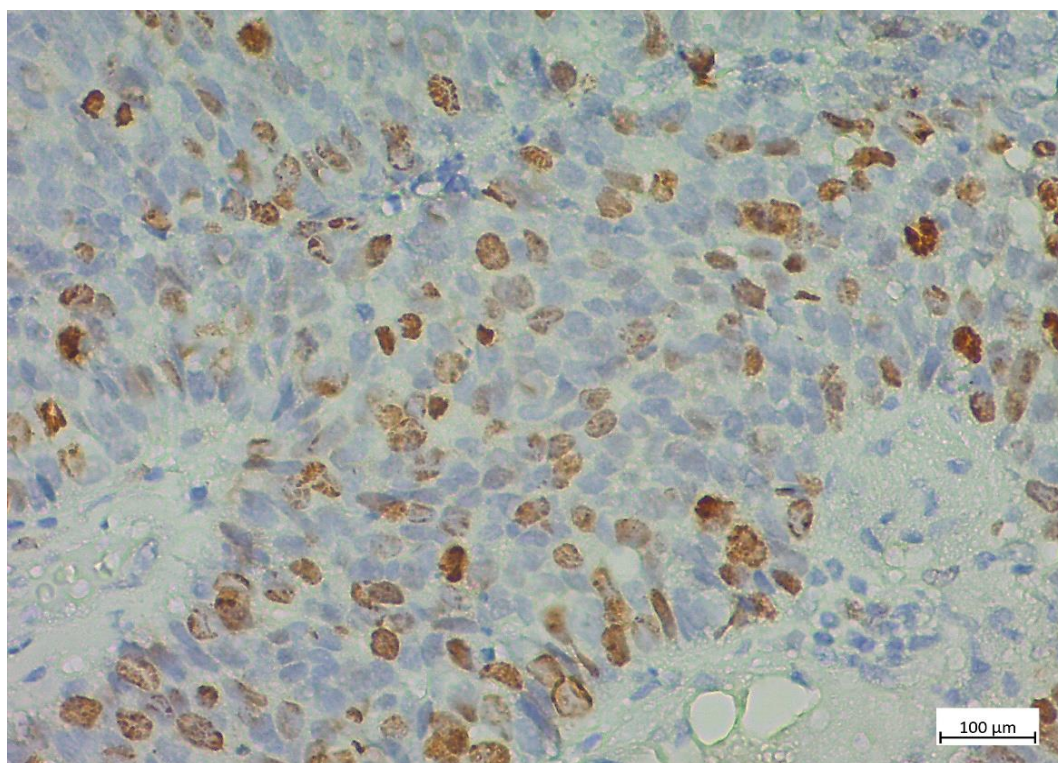


Рис. 3.4.2. Мікрофото. ІГХ-дослідження. Експресія маркеру Кі-67 у НЕН легень Grade 3, 36.×200.

Не виявлено достовірно статистичного зв'язку Ki-67 з некрозами ( $p=0,103$ ) і метастатичним ураженням ( $p=0,070$  — для регіонарних метастазів,  $p=0,135$  — для віддалених). Також Ki-67 достовірно не впливав на виживаність хворих.

Незважаючи на дані літератури і наші сподівання, не виявлено достовірного зв'язку між рівнем експресії РННЗ з морфологічними показниками, що вивчалися. Ні з наявністю некрозів ( $p=0,750$ ) та їх вираженістю ( $p=0,896$ ), ані з регіонарними і віддаленими метастазами ( $p=0,283$  і  $p=0,700$ , відповідно). Також у даному дослідженні рівень експресії РННЗ достовірно не впливав на виживаність хворих.

Виявлений статистично достовірний зв'язок між вираженістю некрозів і показниками виживаності пацієнтів ( $p=0,021$ ), табл. 3.4.1, 3.4.2. Ми розподілили всі спостереження на 2 групи в залежності від вираженості некрозу: 0 — зразки пухлини без вогнищ некрозу; 1 — з дрібними вогнищами некрозу; 2 — з великими вогнищами некрозу. Не виявлено достовірних відмінностей у виживаності пацієнтів груп 0 і 1 ( $p=0,365$ ), а також груп 1 і 2 ( $p=0,054$ ). Однак зв'язок між некрозами і виживаністю був достовірним при порівнянні груп 0 і 2 (без вогнищ некрозу і з великими вогнищами некрозу) ( $p=0,023$ ).

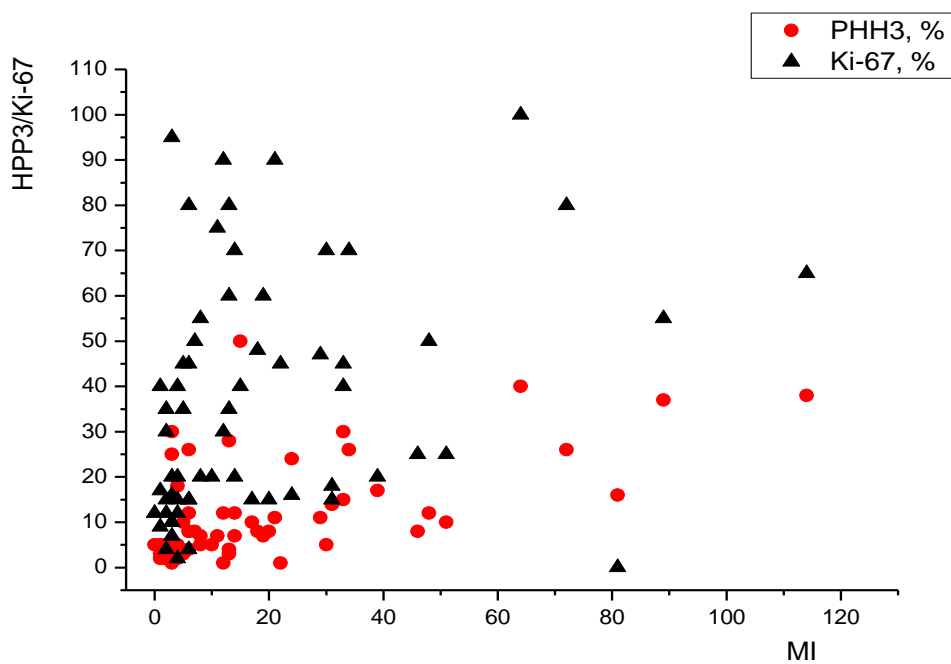


Рис. 3.4.3. На графіку показано залежність між експресією Кі-67 і РННЗ (червоні позначки), і мітотичним індексом і Кі-67 (чорні позначки).

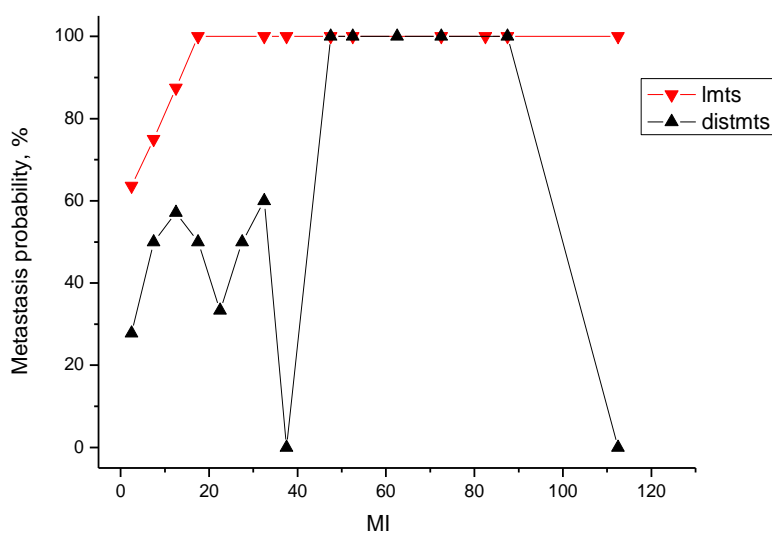


Рис. 3.4.4. Ймовірність виявлення регіонарних і віддалених метастазів за різних значень мітотичного індексу.

Табл. 3.4.1. Вираженість некрозів і процентіль кумулятивної (логранк тест,  $p=0,021$ ).

Некрози	Процентіль					
	25,0%		50,0%		75,0%	
	показник	стандартна похибка	показник	стандартна похибка	показник	стандартна похибка
0					13,600	
1	85,370		85,370		8,470	4,908
2	12,630	13,775	9,230	3,533	2,900	1,028
Всього	45,000	26,600	13,600	10,499	6,270	2,804

Табл. 3.4.2. Середня виживаність. Для цензурування враховано також найбільшу виживаність.

Некрози	В середньому			
	показник	стандартна похибка	95% ДІ	
			нижня межа	верхня межа
0	25,698	3,492	18,853	32,542
1	58,542	13,332	32,411	84,672
2	14,355	5,134	4,293	24,417
Всього	34,267	9,276	16,086	52,449

Середню виживаність хворих в групі 0 не визначено (оскільки більше половини випадків були цензуровані). В групі 1 (дрібні вогнища некрозу) середня виживаність хворих (85 міс.) була достовірно вищою, ніж у групі 2 (великі вогнища некрозу) (9 міс.). Оскільки група 0 була цензурованою, використаний 75-ий процентіль для порівняння виживаності (тобто час, впродовж якого 75% пацієнтів залишалися живими). Для груп 0, 1 і 2 75-ий процентіль склав відповідно 14 міс., 8 міс. і 3 міс. (рис. 3.4.5). Однорічна виживаність становила 100% у групі 0, 67% — у групі 1 і 32% — у групі 2, відповідно.

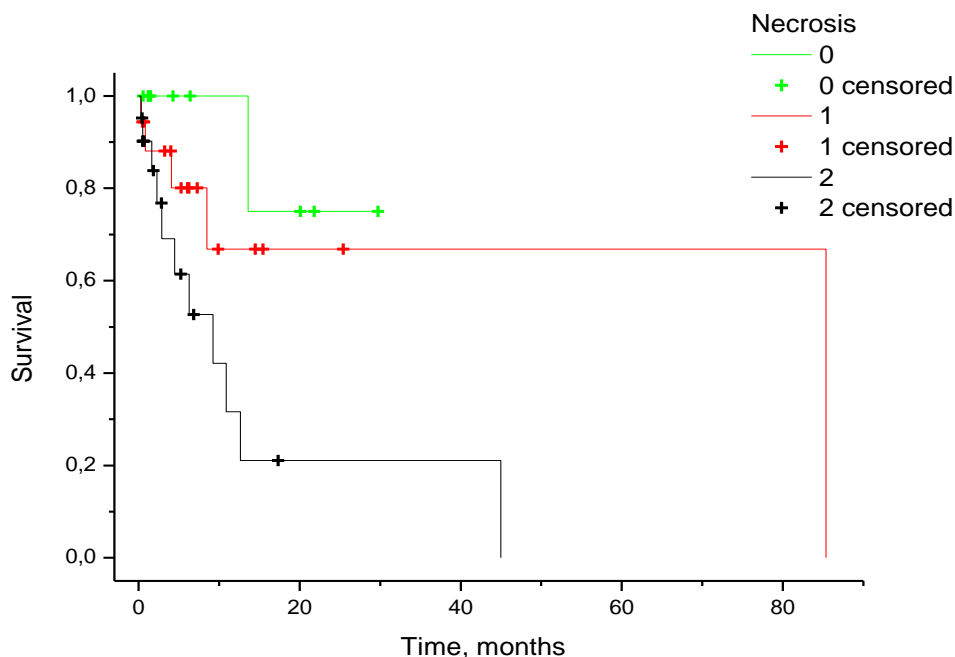


Рис. 3.4.5. Криві виживаності для груп 0 — без вогнищ некрозу, 1 — з дрібними вогнищами некрозу, 2 — з великими вогнищами некрозу.

### 3.5. Рівень експресії Ki-67 як індикатор метастатичного ураження при нейроендокринних новоутвореннях легень

Основна діагностична роль Ki-67 полягає в розмежуванні карциноїдів і низько диференційованих НЕК, особливо за умов недостатньої кількості матеріалу для дослідження (малі або краш-біопсії). Оцінка проліферативної активності за Ki67 — набагато більш зручний і точний метод, ніж підрахунок мітозів, оскільки Ki-67 охоплює більшу частину мітотичного циклу (G1–S–G2-фази) і може «висвітити» проліферуючі клітини за відсутності видимих фігур мітозу [71, 125]. Ki-67 є обов'язковим критерієм грейдінгу НЕН легені (оскільки у такій ситуації саме ступінь диференціювання вважається основним прогностичним критерієм) [96, 130, 140].

Наразі значну кількість аспектів клінічної поведінки НЕН різної локалізації наразі вивчено недостатньо, зокрема, метастатичний патерн, але, за даними літератури, метастатичне ураження лімфатичних вузлів є

несприятливим прогностичним чинником [69, 84, 106, 148]. На момент встановлення діагнозу НЕН легень метастази наявні щонайменше у 36–43% пацієнтів [42, 86, 151]. І хоча ТС і АС вважаються набагато менш агресивними, ніж НЕК легень, при них також виявляють регіонарні та віддалені метастази [204, 246].

У нашому дослідженні визначали потенційну цінність рівня експресії Ki-67 як індикатора метастатичного ураження на момент встановлення діагнозу НЕН легень. Дослідження проведене у всіх 113 випадках: 36 резекцій і 77 біопсій, 42 (54,5%) з яких були дрібними. Результати морфологічного та ІГХ-досліджень оцінені двома різними патологами. Для уточнення клінічного перебігу захворювання, знахідок під час КТ і МРТ (регіонарні та віддалені метастази) використані записи у медичній документації.

Для визначення рівня експресії маркера Ki-67 використовували моноклональне антитіло анти Ki-67, клон МІВ-1 (Дакко, USA). Позитивною ІГХ-реакцією на Ki-67 вважали ядерне забарвлення клітин пухлини. У кожному зразку досліджено 5 мікроскопічних полів при збільшенні  $\times 200$ , у кожному з полів зору оцінювали 100 пухлинних клітин для визначення інтенсивності забарвлення та відсотка позитивних клітин.

На момент встановлення діагнозу НЕН легень регіонарні метастази виявлено у 74 (65,49%) хворих. При цьому ізольоване ураження перибронхіальних та інтрапультмональних лімфатичних вузлів відзначено лише у 2 (1,77%) випадках, ураження лімфатичних вузлів середостіння — у 45 (39,82%), лімфатичних вузлів голови та шиї, надключичних, пахвових і віддалених локалізацій — у 27 (23,89%); у 6 (5,31%) хворих встановлено попередній клінічний діагноз «лімфома». У 19 (16,81%) спостереженнях вибірки інформація про ураження лімфатичних вузлів відсутня. У 43 (38,05%) пацієнтів виявлено віддалені метастази, майже у третині випадків (14 спостережень) вони були множинними.



Загальна характеристика вибірки подана у табл. 3.5.1, приклади дослідження рівня активності Ki-67 у НЕН легень різного ступеня диференціювання наведені на рис. 3.5.1–3.5.4.

Табл. 3.5.1. Загальна характеристика вибірки

Показник	НЕН бронхо-легеневої локалізації (n=113)			
	Grade 1	Grade 2	Grade 3	
	TC	AC	LCNEC	SCLC
Кількість спостережень	9 (7,96%)	40 (35,4%)	20 (17,70%)	44 (38,94%)
Чоловіки / жінки	6 / 3	29 / 11	17 / 3	39 / 5
Вік хворих, років	56,8 ДІ 95% (46,1–67,5)	53,4 ДІ 95% (48,8–58,1)	62,7 ДІ 95% (59,7–65,8)	63,2 ДІ 95% (60,7–65,7)
Рівень експресії Ki-67, %	4,1 ДІ 95% (3,3–4,9)	15,8 ДІ 95% (14,1–17,4)	54,4 ДІ 95% (45,5–63,2)	63,4 ДІ 95% (58,5–68,2)

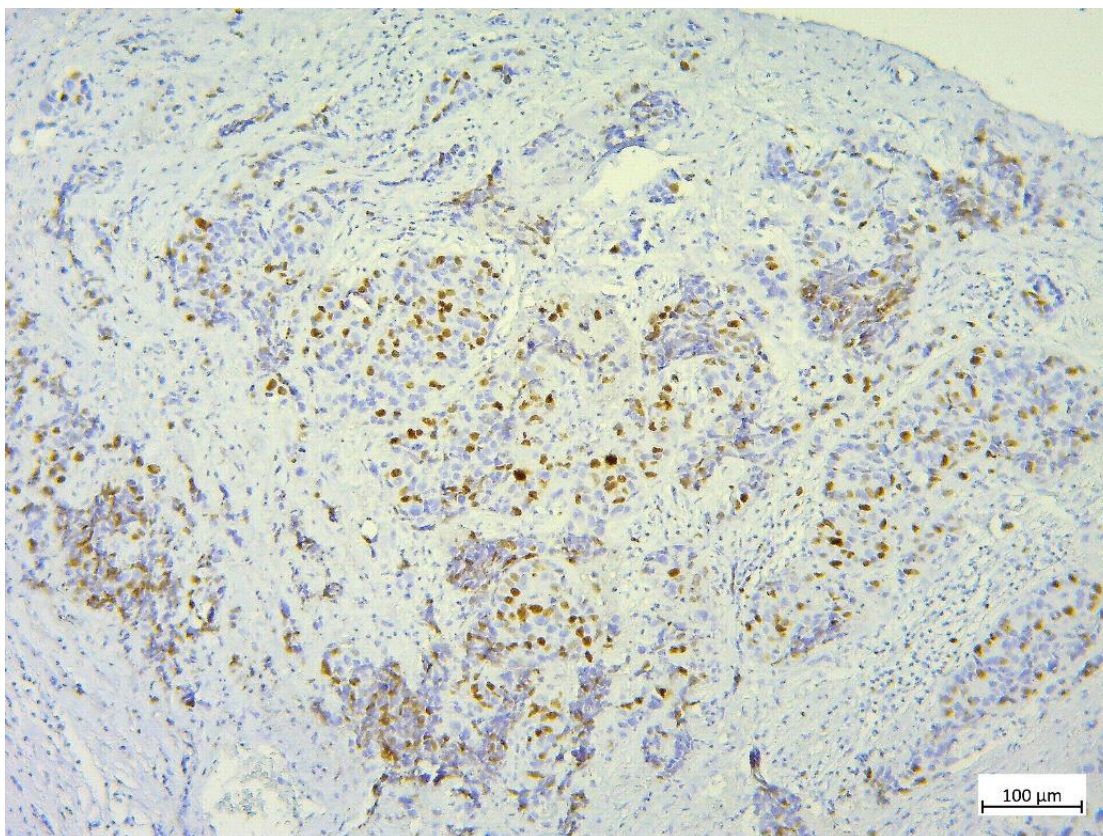


Рис. 3.5.1. Мікрофото. ІГХ. Ki-67=25%, вогнищеве нерівномірне помірно інтенсивне ядерне забарвлення в тканині НЕН легень Grade 2 (АС). Пацієнт, 57 років; T4N2M1, стадія IVB (ураження лімфатичних вузлів середостіння, печінки, надниркової залози справа). Зб.×100.

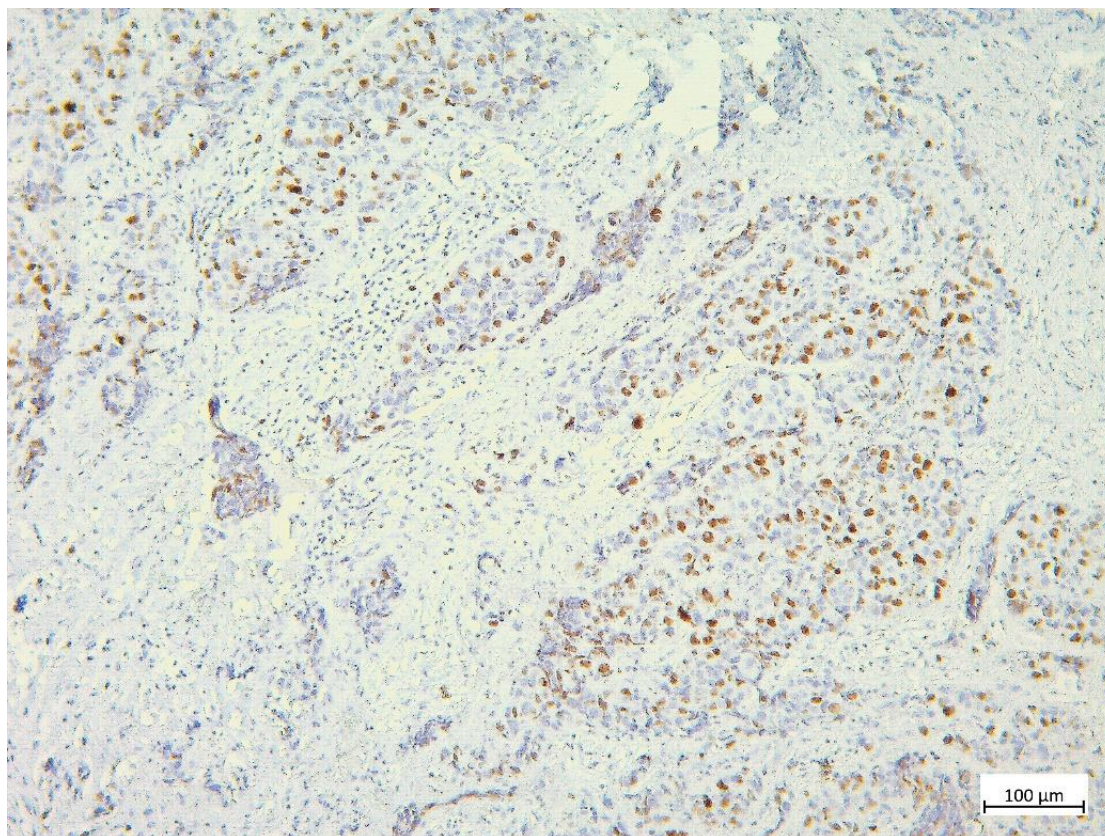


Рис. 3.5.2. Мікрофото. ІГХ. Кі-67=35%, вогнищеве, нерівномірне помірно інтенсивне ядерне забарвлення в тканині НЕН легень Grade 3 (LCNEC). Хворий, 70 років; T3N2M0, стадія ПВ (ураження лімфатичних вузлів середостіння). Зб.×100.

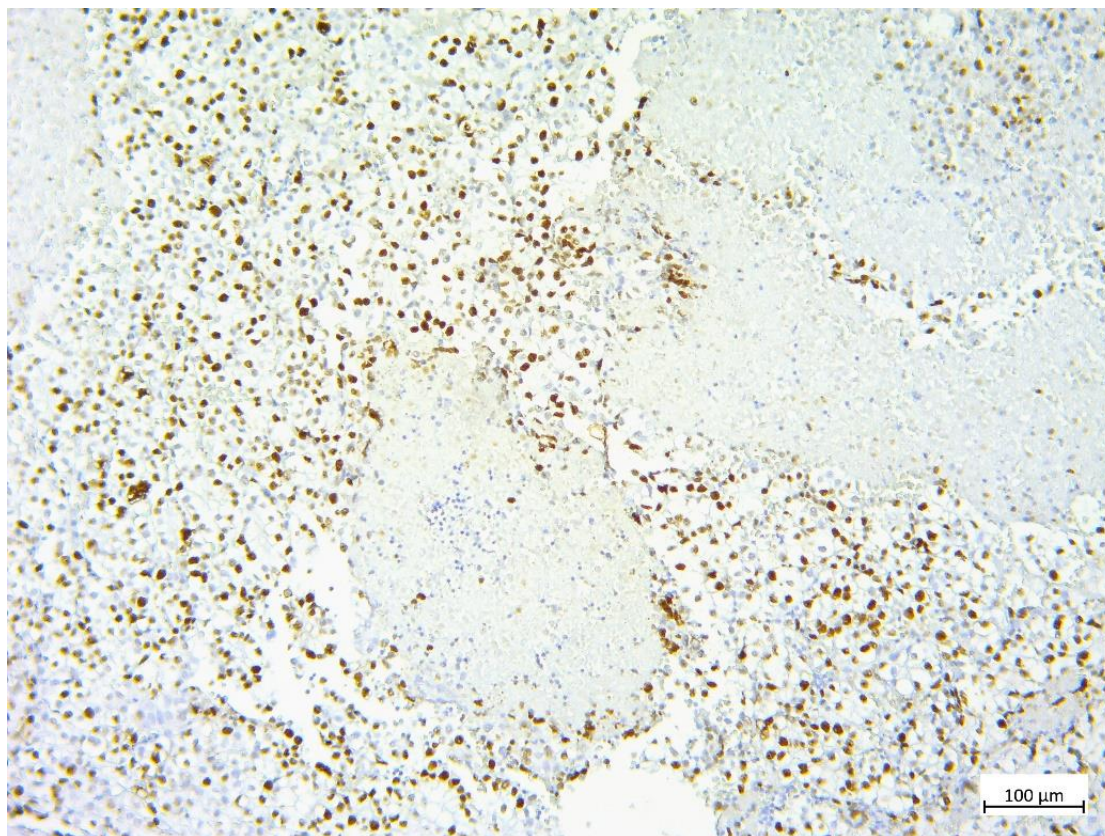


Рис. 3.5.3. Мікрофото. ІГХ. Рівень експресії Ki-67=65%, дифузне інтенсивне ядерне забарвлення в тканині НЕН легень Grade 3 (SCLC). Хворий, 63 роки, T4N2M0, стадія ІІВ (ураження лімфатичних вузлів середостіння). 36.×100.

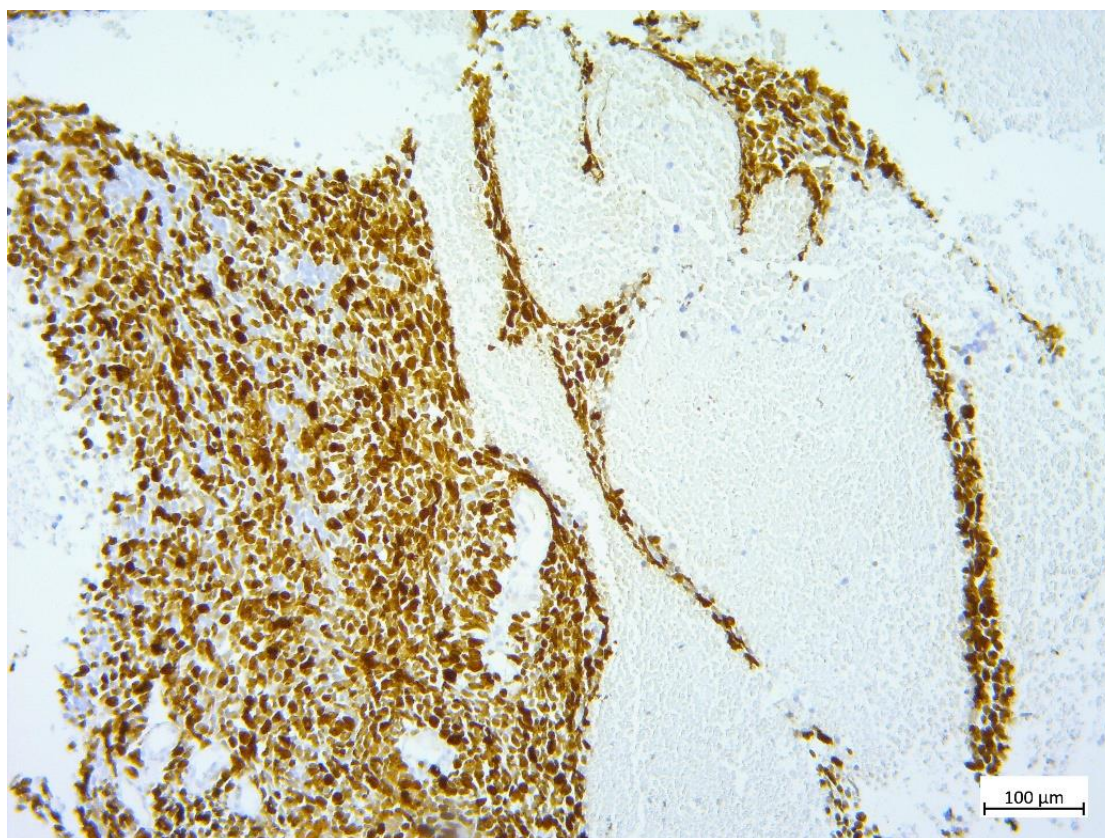


Рис. 3.5.4. Мікрофото. ІГХ. Рівень експресії Ki-67=95%, дифузне інтенсивне ядерне забарвлення в тканині НЕН легень Grade 3 (SCLC). Хворий, 51 рік; T4N3M1c, стадія IVB (ураження лімфатичних вузлів середостіння, надключичних і з віддаленими метастазами у контралатеральній легені, печінці, хребцях). Зб.×100.

Перевірка приналежності вибірки до нормальної генеральної сукупності здійснена за допомогою критерію Шапіро–Уїлка. Розподіл даних відрізнявся від нормального ( $p=0,117$ ).

Ми поєднали випадки за відсутності ураження лімфатичних вузлів та за ізольованого ураження перибронхіальних та інтрапульмональних лімфатичних вузлів у групу «мінімальні ураження» (N0). Під час обробки результатів дослідження використано методи непараметричної статистики (рис. 3.5.5., табл. 3.5.2, 3.5.3).

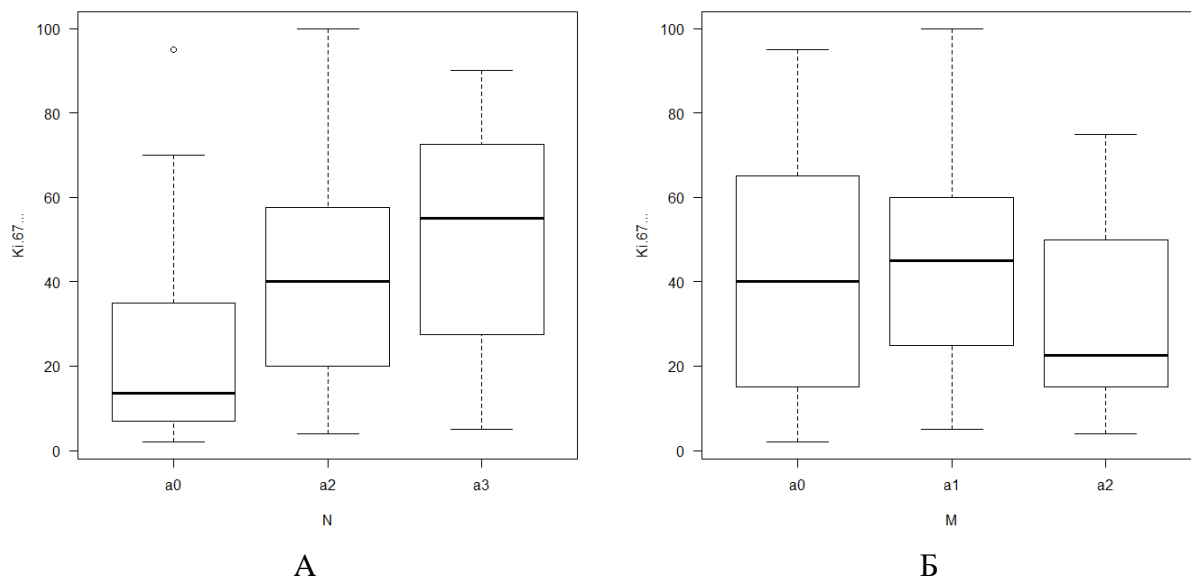


Рис. 3.5.5. Коробковий (box-plot) графік — розподіл ймовірностей рівнів експресії Ki-67 за наявності метастатичного ураження на момент встановлення діагнозу НЕН легень. А: a0 — «мінімальні ураження»; a2 — при ураженні лімфатичних вузлів середостіння; a3 — при ураженні лімфатичних вузлів голови та ший, надключичних, пахвових та інших локалізацій). Б: a0 — за відсутності віддалених метастазів; a1 — за наявності поодиноких віддалених метастазів). Жирна лінія — медіана, обмежувачі вертикальних ліній — мінімальні і максимальні значення, коло — викид. Попарне порівняння груп пацієнтів за наявності регіонарних і віддалених метастазів та за їх відсутності за рівнем експресії Ki-67 здійснене за допомогою критерію Крускала-Уолліса з використанням поправки Холма-Бонферроні.

Табл. 3.5.2. Рівень експресії Ki-67 за відсутності та за наявності метастатичного ураження лімфатичних вузлів на момент встановлення діагнозу НЕН бронхо-легеневої локалізації.

Показник	Кількість спостережень (n=94)			P
	22 (23,40%)	45 (47,87%)	27 (28,72%)	
Ki-67, %	Групи ураження лімфатичних вузлів, міжквартильний інтервал (QI–QIII)			
	N0	N2	N3	
	13,5 (8,0–30,0) <sup>2,3</sup>	40,0 (20,0–57,5) <sup>0</sup>	55,0 (7,5–7,5) <sup>0</sup>	<0,005

Примітка. Група N0 — група «мінімальних уражень»; група N2 — ураження медіастінальних лімфатичних вузлів; група N3 — ураження лімфатичних вузлів голови та шиї, надключичних, пахвових і віддалених локалізацій. Виявлені статистично значущі відмінності між групами N0 і N2 ( $p=0,001$ ), N0 і N3 ( $p=0,066$ ); відмінності між групами N2 і N3 не були статистично значущими ( $p=0,117$ ).

Табл. 3.5.3. Рівень експресії Ki-67 за відсутності та за наявності віддалених метастазів на момент встановлення діагнозу НЕН бронхо-легеневої локалізації.

Показник	Кількість спостережень (n=113)			P
	70 (61,95%)	29 (25,66%)	14 (12,39%)	
Ki-67, %	Групи ураження лімфатичних вузлів, міжквартильний інтервал (QI–QIII)			
	M0	M1	M2	
	40,0 (15,0–65,0)	45,0 (25,0–60,0)	23,5 (15,0–46,75)	>0,005

Примітка. Група M0 — віддалені метастази відсутні; група M1 — наявні поодинокі віддалені метастази; група M2 — віддалені метастази множинних локалізацій. Відмінності рівнів експресії Ki-67 між групами M0 і M1 виявилися статистично значущими ( $P=0,0003$ ), однак відмінності між групами M0 і M2 ( $P=0,451$ ), M1 і M2 не були статистично значущими ( $P=0,278$ ).

Для визначення рівня експресії Ki-67 як індикатора поширеного ураження лімфатичних вузлів на момент встановлення діагнозу НЕН бронхолегеневої локалізації використано ROC-криву. «Порогове значення» Ki-67 — 18% (95% ДІ 15–51,9%). Рівень експресії Ki-67  $\geq 18\%$  можна вважати індикатором ймовірного поширеного ураження лімфатичних вузлів (середостіння, голови та шиї, надключичних, пахвових та інших локалізацій). Ця модель визнана хорошою (AUC=0,75, специфічність методу — 70%, чутливість — 82,4%) (рис. 3.5.6).

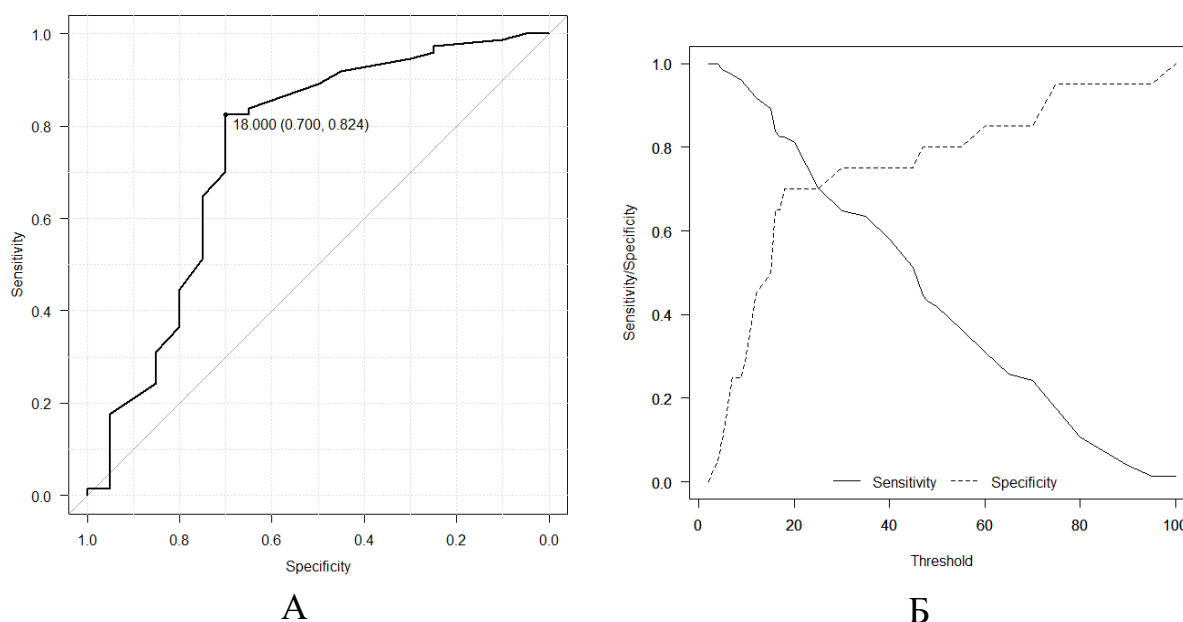


Рис. 3.5.6. А — хороша ROC-крива (AUC=0,75): діагностична модель поширеного ураження лімфатичних вузлів в залежності від рівня експресії Ki-67 на момент встановлення діагнозу НЕН легень. Б — специфічність методу 70%, чутливість 82,4%.

Визначений нами «критичний» рівень експресії Ki-67  $\geq 18\%$  не є високим і «вкладається» у показники Grade 2 (від 5 до 30%), але має викликати певну настороженість клініцистів щодо ймовірної поширеності патологічного процесу, що зазвичай є свідченням несприятливого прогнозу.



### **3.6. Експресія TOP2A у нейроендокринних новоутвореннях легень, її значення**

Однією з основних проблем нейроендокринної патології є диференціювання агресивних, високо злоякісних пухлин від тих, що є більш високо диференційованими і характеризуються відносно доброякісним перебігом [96]. Морфологічні критерії є «золотим стандартом» грейдингу НЕН легень, але практикуючий патолог стикається з ситуаціями, коли чітке розмежування між ТС і АС або АС та LCNEC лише за їх допомогою практично неможливе, виникає необхідність застосування додаткових методів дослідження для коректної діагностики та прогнозування [110].

Коректна діагностика при НЕН легень має критичне значення для визначення прогнозу, однак інколи це досить складне завдання. Дотепер достовірність грейдингу за рівнем експресії Ki-67 є предметом дискусій. Інколи показник Ki-67 у високо диференційованих НЕН легень «перекривається» з таким у низько диференційованих, що свідчить про гірший прогноз, ніж можна було б припустити за результатами морфологічного дослідження і спричиняє певні непорозуміння між патологами і клініцистами [84, 100]. Для максимально акуратної і точної діагностики доцільно використати додаткові маркери проліферації (крім Ki-67), наприклад, TOP2A. Хоча, за даними літератури, рівні експресії і прогностичний ефект TOP2A різняться за різних варіантів онкопатології [5, 23].

TOP2A має важливе значення у регуляції топології ДНК під час реплікації, транскрипції та сегрегації хромосом і тісно пов'язана з проліферацією клітин, зокрема, у злоякісних новоутвореннях. Вважається, що експресія TOP2A є цінним інструментом у діагностиці високо і низько диференційованих пухлин [122]. За даними літератури, підвищення рівнів експресії Ki-67 і TOP2A корелюють один з одним, низьким ступенем диференціювання новоутворення, а також стадією і несприятливим прогнозом [241]. І хоча патерн експресії цих маркерів у клітинному циклі відрізняється

(пік експресії Ki-67 припадає на G2/M фазу, натомість TOP2A пов'язана з синтезом ДНК — пізня S і G2-M фази), вони є критичними в оцінці проліферативної активності та агресивності новоутворення [142].

У нашому дослідженні оцінено можливість використання рівня експресії TOP2A в якості прогностичного критерія при НЕН легень. Оцінено кореляцію між рівнями експресії TOP2A і Ki-67. Також визначали зв'язок рівня експресії TOP2A з вираженістю некрозу і наявністю метастазів і виживаністю пацієнтів.

Дослідження проведене на 50 гістологічних блоках НЕН легень: на матеріалі 18 (36%) резекцій і 32 (64%) біопсій, 16 (50%) з яких були малими або роздробленими. Використано ІГХ-маркер Topoisomerase II alpha, клон EP93 (Epitomics, France). Враховували лише ядерне забарвлення. Для підрахунку у кожному зі зразків обирали 5 полів зору мікроскопа при збільшенні  $\times 200$ ; у кожному з полів зору рахували 100 клітин новоутворення для визначення інтенсивності ІГХ-реакції та проценту позитивних клітин.

Використані методи непараметричної статистики. Розподіл Ki-67 і TOP2A визначали за допомогою U тесту Манна–Уїтні. Метод рангової кореляції Спірмена використаний для визначення кореляції рівнів експресії Ki-67 і TOP2A, а також залежності рівнів експресії TOP2A від наявності і поширеності некрозу. ROC-крива використана для визначення прогностичної цінності TOP2A. Виживаність пацієнтів оцінювали за допомогою методу Каплан–Мейєра та моделлю моноваріантної регресійної Cox-моделі співвідношення ризиків. Логранк тест застосований для визначення достовірності відмінностей виживаності пацієнтів за різного рівня експресії TOP2A.

Вік хворих від 29 до 76 років, співвідношення чоловіки / жінки =4,55:1. У цій вибірці було 6 (12%) (4Ч / 2 Ж) пацієнтів молодого віку, 22 (44%) (16 Ч / 6 Ж) середнього віку і 22 (44%) хворих (21 Ч / 1 Ж) похилого віку.

Вибірка була цензурованою. Строки спостереження суттєво різнилися: від 10 діб до 7,1 року, у середньому 3,81 міс. Наслідки не вдалося простежити у 9 (18%) випадках. 12 (24%) хворих померли, у таких випадках загальна

виживаність становила у середньому 2,41 міс. Згідно записів у медичній документації, 29 (58%) пацієнтів живі: у таких випадках період спостереження також сильно варіював і становив у середньому 4,61 міс.

На момент встановлення діагнозу НЕН легень регіонарні метастази були наявні у 36 (72%) випадках, віддалені — у 21 (42%); у 6 (12%) спостереженнях метастатичне ураження не виявлене. Віддалені метастази в печінці виявлені у 9 (42,8%) випадках, в кістках — у 4 (19%), в контралатеральній легені — у 3 (14,3%), у суглобах і головному мозку — по 2 (9,5%) спостереження, у наднирнику — в 1 (4,7%) пацієнта. Множинні віддалені метастази відзначали у 5 (23,8%) хворих. У 7 (33,3%) випадках точна локалізація віддалених метастазів не зазначена.

В дослідження включені 1 (2%) зразок ТС, 17 (34%) АС, 7 (14%) LCNEC, і 25 (50%) SCLC.

Морфологія зразків НЕН легень, рівні експресії маркерів Ki-67 і TOP2A представлені в табл. 3.6.1 і на рис. 3.6.1–3.6.6.

Табл. 3.6.1. Ki-67, TOP2A, некрози і метастази при НЕН легень Grade 2 і Grade 3\*

Показник		НЕН легень		p
		Grade 2 18 (36%) випадків	Grade 3 31 (62%) випадків	
Ki-67, %		12,8 ДІ 95% (11–15%)	50,0 ДІ 95% (42–58%)	0,053
TOP2A, %		10,3 ДІ 95% (5–15%)	25,9 ДІ 95% (18–34%)	0,058
Метастази	в лімфатичних вузлах	10 (20%)	26 (52%)	—
	віддалені	5 (10%)	16 (32%)	
Некроз	відсутній	5 (10%)	7 (14%)	
	помірно виражений	6 (12%)	10 (20%)	
	виражений	7 (14%)	14 (28%)	

\* Один випадок — пацієнт при ТС (T2N0M0, стадія ІВ), Ki-67=2%, TOP2A=0% не включений у цю таблицю.

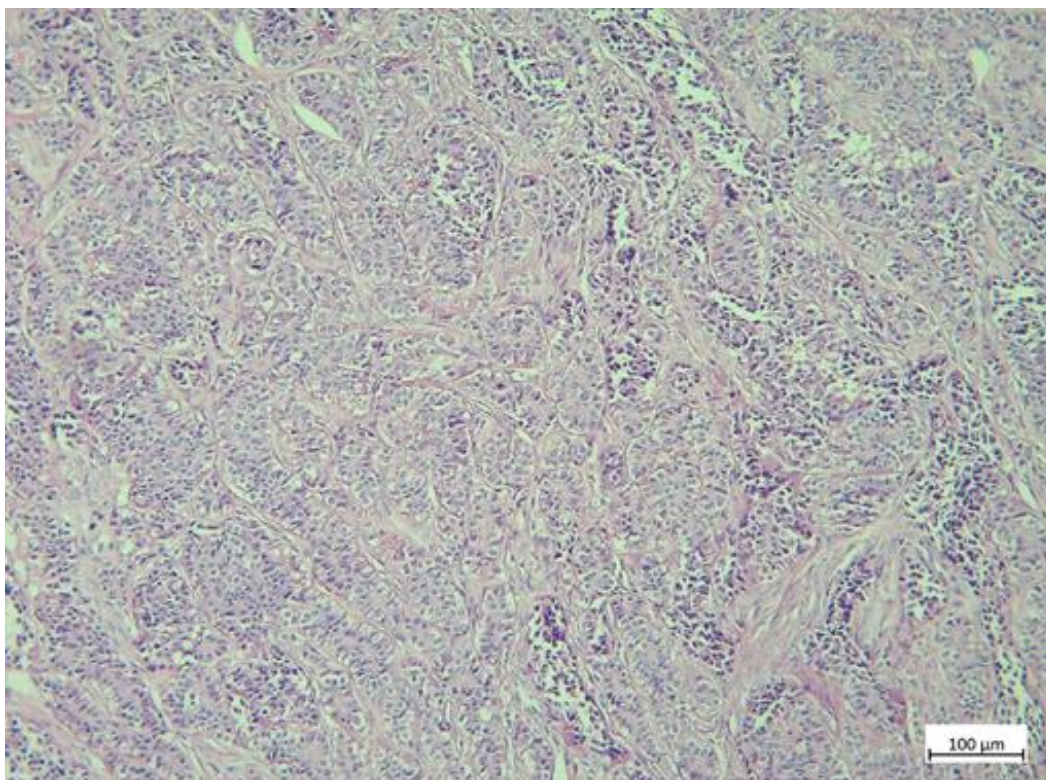


Рис. 3.6.1. Мікрофото. НЕН легень, Grade 2. Переважно солідний тип росту з «гніздами» клітин пухлини у фіброзній стромі, дрібні поодинокі вогнища некрозу. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб.×100.

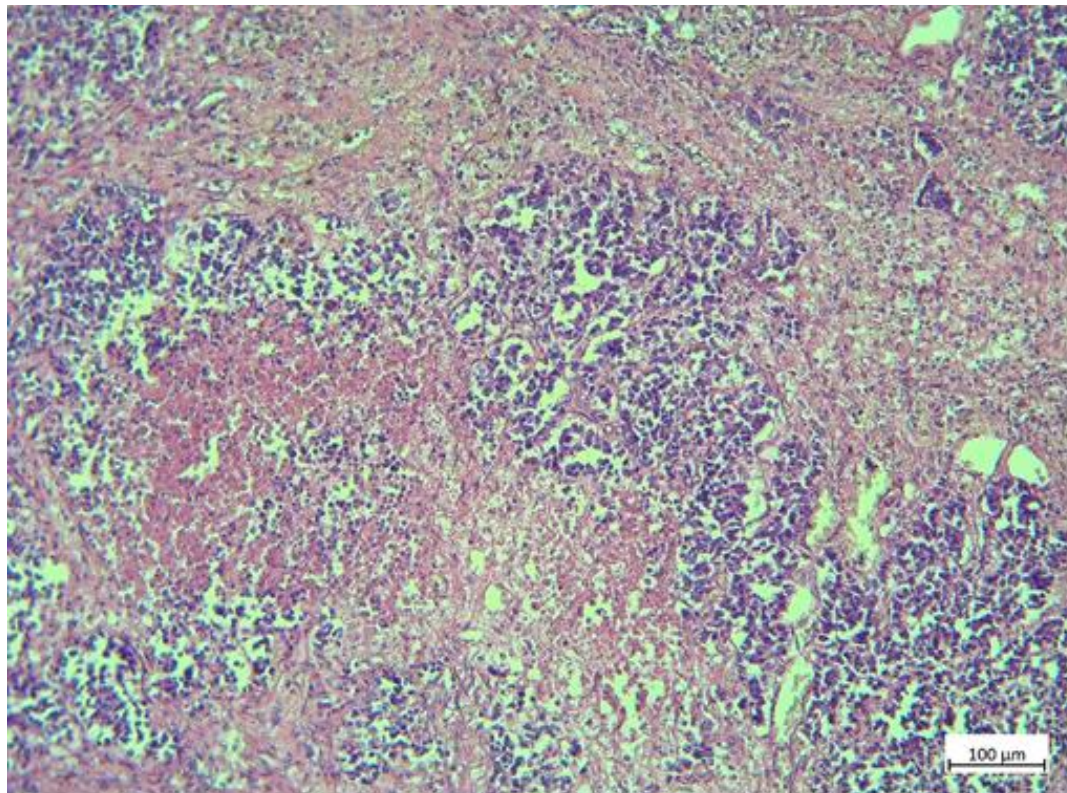


Рис. 3.6.2. Мікрофото. НЕН легень, Grade 3 з множинними крупними вогнищами некрозу, з крововиливами. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб.×100.

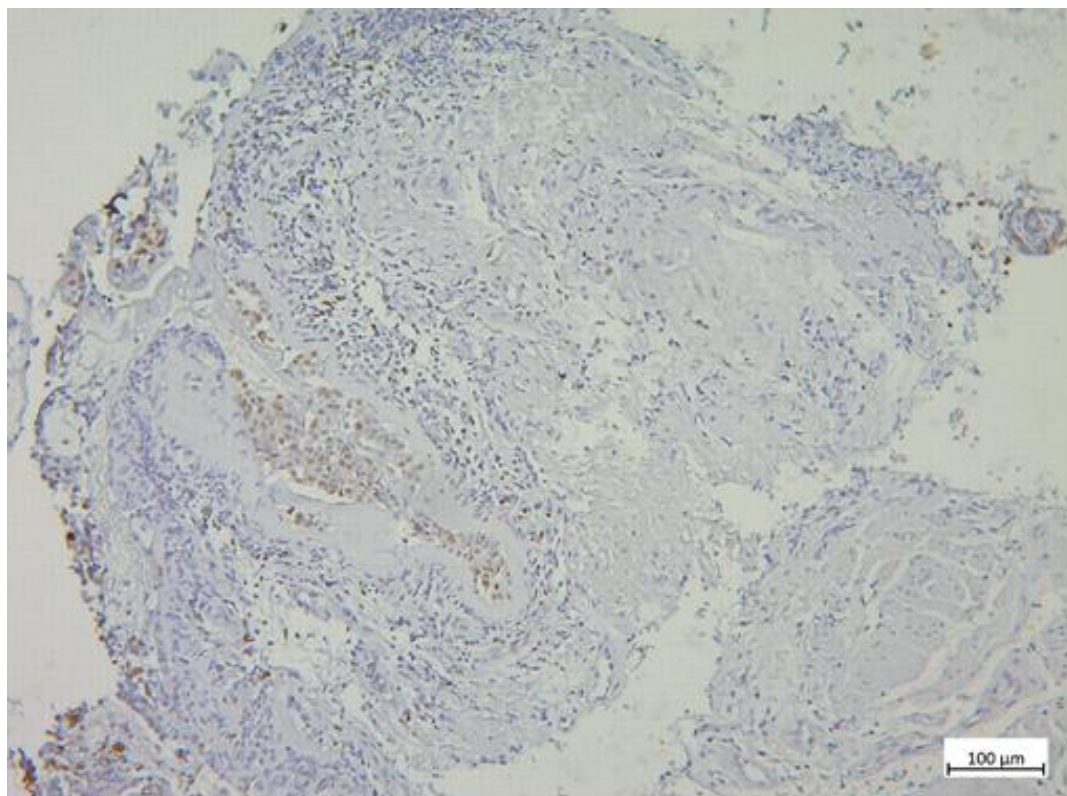


Рис. 3.6.3. Мікрофото. ІГХ-дослідження. Локальне ядерне забарвлення на Ki-67 (15%) у НЕН легень Grade 2. 3б.×100.

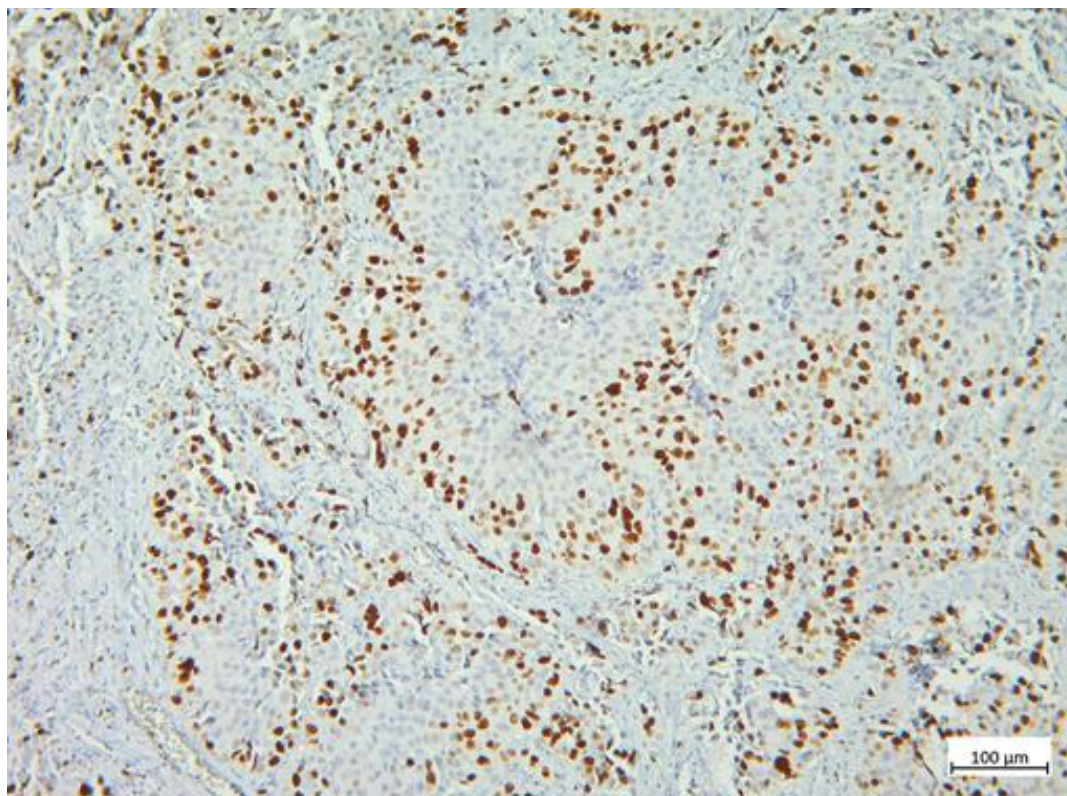


Рис. 3.6.4. Мікрофото. ІГХ-дослідження. Дифузне ядерне забарвлення на Ki-67 (60%) у НЕН легень Grade 3. 3б.×100.

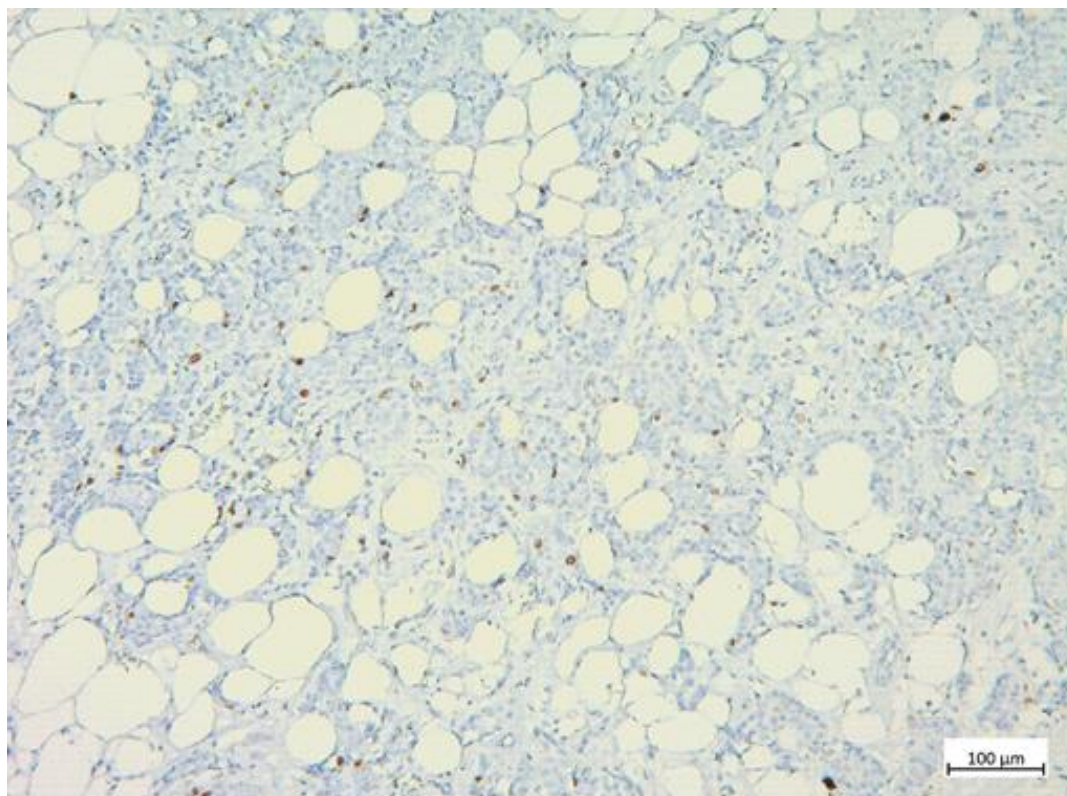


Рис. 3.6.5. Мікрофото. ІГХ-дослідження. Низький рівень експресії TOP2A (7%) у НЕН легень Grade 3. 3б.×100.

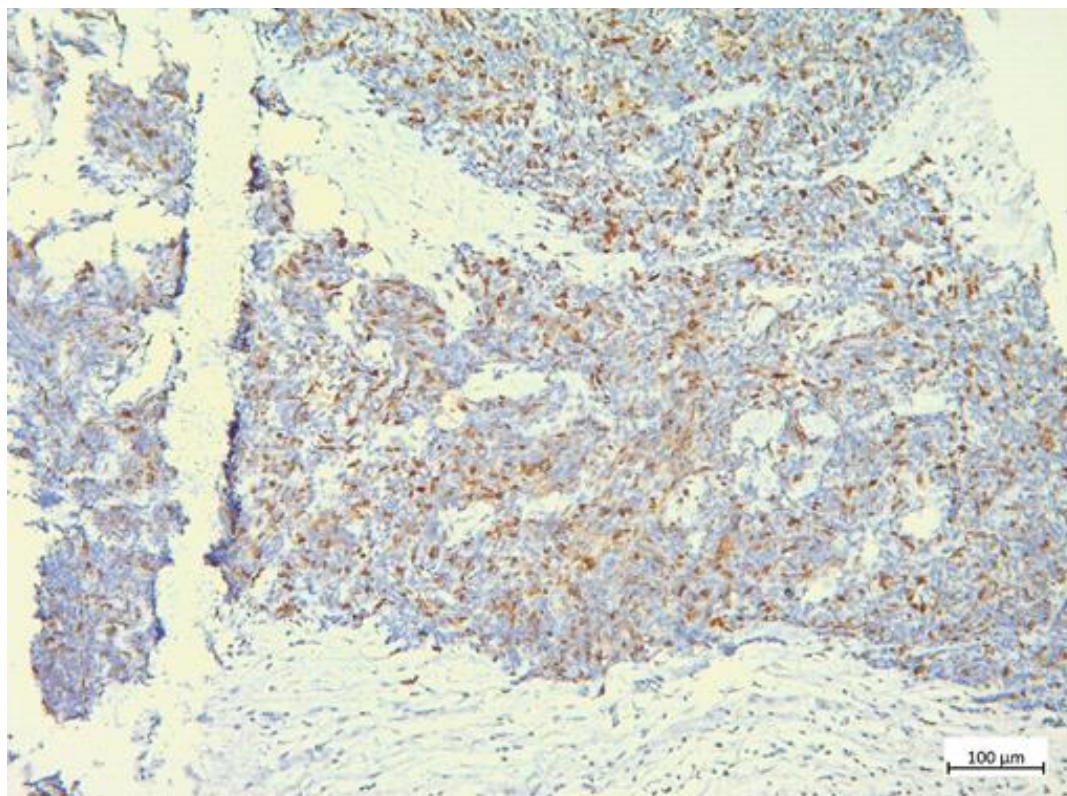


Рис. 3.6.6. Мікрофото. ІГХ-дослідження. Високий рівень експресії TOP2A (65%) у НЕН легень Grade 3. 3б.×100.

Виявлена сильна кореляція між інтенсивністю ядерного забарвлення клітин пухлини на Ki-67 і TOP2A (рангова кореляція Спірмена,  $r=0,603$ ,  $p=0,00000362$ ).

Рівень експресії Ki-67 в межах 2–100%. Ki-67  $\leq 5\%$  виявлений лише в 1 (2%) зразку НЕН легень; Ki-67 5–30% — у 18 (36%); Ki-67  $>30\%$  — у 31 (62%). Вогнища некрозу виявлені у 37 (74%) зразках, при цьому у 21 (42%) випадку — екстенсивні. Середній рівень експресії Ki-67 за відсутності некрозу становив 30,8% (2–80%) (95% ДІ 16–45%). За наявності некрозу середнє значення Ki-67 становило 37,3% (показник коливався в межах 4–100%) (95% ДІ 29–46%). Відмінності між цими двома групами (за відсутності вогнищ некрозу та за їх наявності) були достовірними (тест Мана–Уїтні,  $p=0,02$ ). Зазвичай у НЕН легень Grade 2 наявні дрібні поодинокі вогнища некрозу, у Grade 3 ці вогнища множинні і протяжні, нерідко у поєднанні з масивними крововиливами. Однак, у нашому дослідженні не виявлено зв'язку між рівнем експресії Ki-67 і вираженістю некрозу (коефіцієнт кореляції Спірмена,  $p=0,078$ ; тест Мана–Уїтні,  $p=0,316$ ).

Дані літератури щодо рівнів експресії TOP2A та їх оцінки досить суперечливі. Різні автори пропонують використовувати різні порогові значення експресії TOP2A, але переважно  $>30\%$  [5]. У нашому дослідженні рівні експресії TOP2A були гетерогенними (від 0 до 85%). Рівень експресії TOP2A  $\geq 5\%$  вважали позитивним, він виявлений нами у 38 (76%) спостережень. TOP2A  $\geq 35\%$  виявлений нами у 10 (20%) спостереженнях і розцінений як гіперекспресія маркеру. У 8 (16%) випадках рівень експресії TOP2A не перевищував 5%; ще у 4 (8%) зразках НЕН легень ІГХ-реакція на TOP2A була негативною. За позитивної реакції рівень експресії TOP2A становив у середньому 25,6% (95% ДІ 20–32%); у випадку гіперекспресії — 51,9% (95% ДІ 41–63%); і 1,75% (95% ДІ 1–2%), якщо рівень експресії маркеру не перевищував 5%. Виявилось, що рівень експресії TOP2A достовірно пов'язаний з наявністю некрозу в тканині НЕН легень (коефіцієнт кореляції Спірмена,  $r=0,318$ ,  $p=0,0242$ ) та його вираженістю ( $r=0,303$ ;  $p=0,0323$ ).

Хоча рівень експресії Ki-67 зростає за наявності у зразках пухлини вогнищ некрозу, натомість вираженість некрозу не мала такого впливу. Також не виявлено достовірної залежності між рівнем експресії Ki-67 і наявністю метастазів.

У той же час виявлений зв'язок між рівнем експресії TOP2A та кількома ключовими характеристиками НЕН легень: наявністю і вираженістю некрозу, метастатичним ураженням лімфатичних вузлів. Виявлений достовірний лінійний прямий зв'язок між рівнями експресії Ki-67 і TOP2A (коефіцієнт кореляції Спірмена,  $r=0,603$ ;  $p=0,00000362$ ). Більш високі рівні експресії Ki-67 відповідали збільшенню показника TOP2A.

Ступінь ураження лімфатичних вузлів є прогностичним чинником для більшості НЕН різних локалізацій; більш «високі» показники асоційовані з поганим прогнозом [25, 90, 148]. У нашому дослідженні оцінено прогностичну цінність рівня експресії TOP2A для метастатичного ураження лімфатичних вузлів на момент встановлення діагнозу НЕН легень (рис. 3.6.7, 3.6.8).

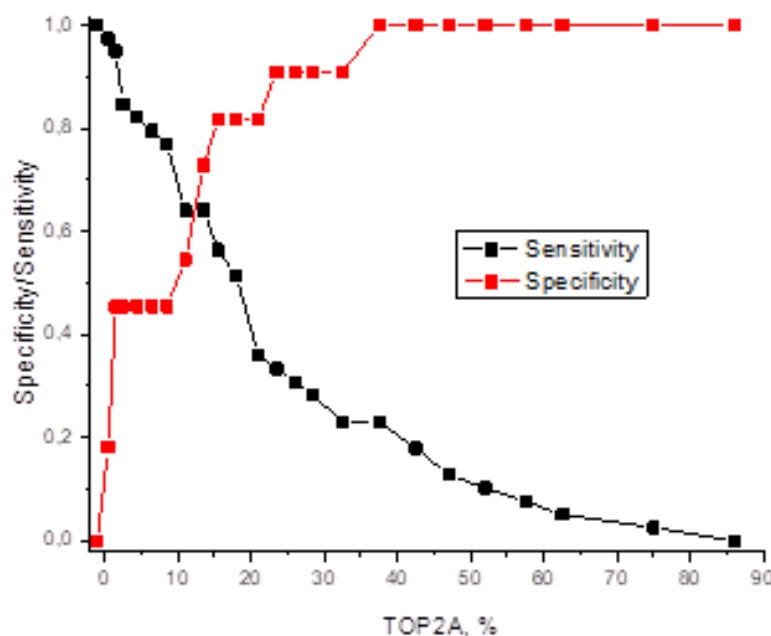


Рис. 3.6.7. Чутливість і специфічність прогнозування метастатичного ураження лімфатичних вузлів при НЕН легень за рівнем експресії маркеру TOP2A.



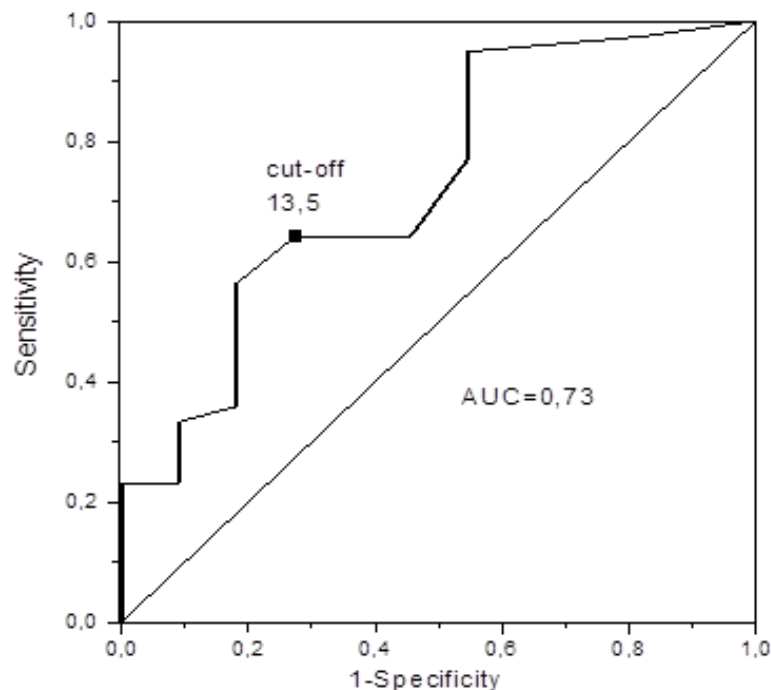


Рис. 3.6.8. ROC-криву можна вважати хорошою ( $AUC=0,73$ ): діагностичний тест для визначення метастатичного ураження лімфатичних вузлів в залежності від рівня експресії TOP2A.

Рівень експресії TOP2A  $>13\%$  є прогностичним чинником для метастатичного ураження лімфатичних вузлів при НЕН легень; при TOP2A  $\leq 13\%$  метастази у лімфатичних вузлах, як правило, були відсутні (чутливість методу 64%, специфічність 73%).

TOP2A як кількісна змінна, мала статистично достовірний вплив на показник виживаності (Cox-регресія, співвідношення ризиків 1,038; (95% ДІ 1,005–1,073),  $p=0,024$ ), натомість для Ki-67 такої закономірності не виявлено ( $p=0,106$ ). За допомогою тесту Каплан–Мейєра визначена медіана виживаності у вибірці — 14 міс. (95% ДІ 6–21 міс); 1-річна виживаність 58%. Для порівняння вибірку розділили на 2 групи: 23 (46%) спостереження при TOP2A  $\leq 13\%$  і 27 (54%) випадків при TOP2A  $>13\%$  (з урахуванням отриманих нами даних про рівень експресії TOP2A, значущий для метастатичного ураження лімфатичних вузлів). Виживаність пацієнтів у зазначених групах достовірно відрізнялася (Логранк-тест,  $p=0,006$ ). Медіана виживаності при TOP2A  $\leq 13\%$

становила 45 міс., при TOP2A >13% — лише 8 міс.; однорічна виживаність 100% і 39% відповідно (рис. 3.6.9).

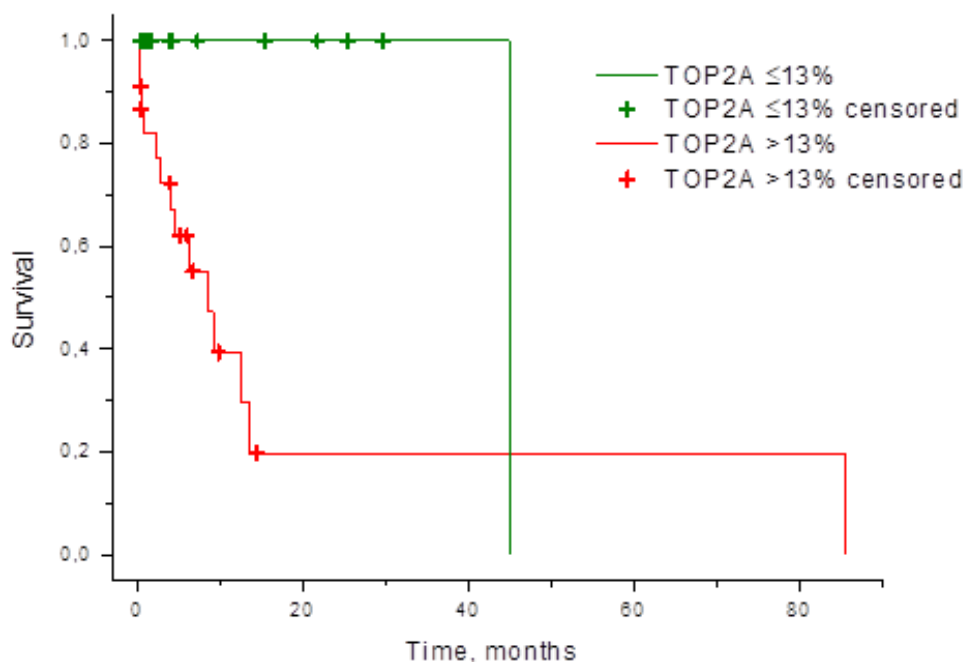


Рис. 3.6.9. Загальна виживаність достовірно відрізнялася у групах хворих при TOP2A  $\leq 13\%$  і TOP2A  $> 13\%$  (логранк-тест,  $p=0,006$ ).

Отже, рівень експресії TOP2A може бути використаний в якості додаткового прогностичного чинника при НЕН легень. Збільшення цього показника пов'язане з метастатичним ураженням лімфатичних вузлів і скороченням тривалості життя пацієнтів.

### 3.7. Експресія PD-L1: кореляція з морфологічними характеристиками і прогностичне значення

Коректний діагностичний підхід та розуміння біології пухлин — ключові компоненти для встановлення правильного діагнозу та вибору ефективної тактики ведення пацієнта. Диференційна діагностика НЕН легень на сучасному етапі здійснюється з урахуванням гістологічних та ІГХ-критеріїв. В діагностиці НЕН легень ІГХ відіграє вирішальну роль, оскільки більш ніж у 70% випадків використовується біопсійний матеріал, і велика

кількість таких біопсій є малими або подрібненими, що не дозволяє в повному обсязі оцінити морфологічну складову. Рівень експресії певних ПХ-маркерів має не тільки важливу діагностичну, а й прогностичну цінність.

Особливості проліферації клітин відіграють важливу роль у прогресії пухлини. Але здатність клітин новоутворення до уникнення імунного контролю також має неабияке значення [4, 174, 234].

Ліганд програмованої смерті клітин (PD-L1) і його рецептор — білок програмованої смерті (PD-1) — основні молекули імунних точок контролю, відповідальних за прогресію пухлини шляхом негативної регуляції імунної відповіді. Виражена експресія PD-L1 спостерігається на поверхні пухлинних клітин, зв'язування з PD-1 на поверхні активованих Т-лімфоцитів спричиняє супресію останніх: таким чином клітини новоутворення уникають імунного контролю [135, 224, 242].

Блокування шляхів PD-L1 вважається перспективним терапевтичним напрямком у багатьох злоякісних пухлинах з обмеженим вибором альтернатив лікування і поганим прогнозом (зокрема, при меланомі, пухлинах легень і нирок тощо) [31, 59, 60, 77, 78, 123, 162, 210, 224]. Також, деякі дослідники відзначають незначне, але достовірне збільшення загальної виживаності пацієнтів при додаванні антитіл до PD-1 до стандартної хіміотерапії під час лікування SCLC [166]. У деяких дослідженнях дискутується можлива прогностична цінність біомаркеру PD-L1 [11, 38].

За даними літератури, до 50% спостережень недрібноклітинного раку легень виявляються позитивними на PD-L1. Але при НЕН легень PD-L1 експресує лише невелика частка низько диференційованих карцином: до 10% LCNEC і близько 5% SCLC, карциноїди практично завжди негативні на PD-L1 [202, 208, 216].

Підвищення рівня експресії PD-L1 клітинами пухлини має важливе значення для уникнення ними імунного контролю [153, 188]. В експерименті на культурах клітин достовірно вищий рівень експресії PD-L1 виявлений у клітинах метастатичних новоутворень на відміну від клітин пухлин, які не

метастазували [135]. За даними деяких авторів, у різних злоякісних пухлинах рівень експресії PD-L1 корелює з метастатичним ураженням і поганим прогнозом [58, 60, 103, 153, 161, 188, 202, 216]. Медіана загальної і безрецидивної виживаності у PD-L1-позитивних випадках були нижчими, ніж у PD-L1-негативних. Хоча, дані щодо зв'язку між рівнем експресії PD-L1 та біологічними характеристиками й «поведінкою» пухлини досить суперечливі [60, 79, 206].

Прогностична цінність рівня експресії PD-L1 у НЕН легень потребує уточнення; дані літератури з цього приводу вкрай нечисленні та суперечливі [188, 202]. За даними нещодавніх досліджень, PD-L1 корелює з виснаженням Т-клітин, незалежно від пухлинної гіпоксії та свідчить про прогресію пухлини, однак, комплексна оцінка мікрооточення не використовується при НЕН.

У нашому дослідженні оцінювали рівень експресії PD-L1 у НЕН легень Grade 2 і Grade 3 та визначали його зв'язок з клініко-патологічними характеристиками і наслідками захворювання. Проведене ІГХ-дослідження з використанням антитіла до PD-L1 (клон 22C3, Dako, USA) на матеріалі 40 біопсій НЕН легень: 13 (32,5%) спостережень Grade 2 і 27 (67,5%) — Grade 3. Експресію PD-L1 оцінювали з урахуванням інтенсивності та площі (0–100%) забарвлення [155, 206, 216]. Результат реакції вважали позитивним при забарвленні на PD-L1  $\geq 1\%$  клітин новоутворення [198].

В залежності від рівня експресії PD-L1 (відсоток клітин пухлини з позитивним мембранним забарвленням) спостереження розподілені на групи: група 0 — PD-L1-негативні зразки НЕН легень; група 1 — PD-L1 1–5%; група 2 — PD-L1  $\geq 6\%$ . Найвищий рівень експресії PD-L1 дорівнював 20%, надмірний рівень експресії ( $>30\%$ ) у нашому дослідженні не виявлений. В усіх випадках забарвлення було локальним, слабким або помірним.

Ми оцінили кореляцію між рівнем експресії PD-L1 і деякими клініко-патологічними характеристиками при НЕН легень: віком і статтю пацієнтів, ступенем диференціювання пухлини, індексом проліферації Ki-67, вогнищами некрозу, фіброзом, лімфоцитарною інфільтрацією, неоангіогенезом,

відділеними метастазами і виживаністю хворих за допомогою методів непараметричної статистики (тест Мана–Уїтні, тест Крускала–Уолліса, рангова кореляція Кендала і Спірмена; метод Сох-регресії використаний для оцінки виживаності).

Вік пацієнтів від 3 до 76 років, співвідношення чоловіки / жінки 4,71:1. У цій вибірці було 3 (7,5%) пацієнтів (2Ч / 1 Ж) молодше 44 років; 10 (25%) хворих (8 Ч / 2 Ж) віком 45–59 років; і 26 (65%) пацієнтів (22 Ч / 4 Ж) віком від 60 до 74 років; і ще один пацієнт чоловічої статі віком 76 років.

В дослідження включені 14 (35%) зразків АС (Grade 2) і 27 (65%) зразків Grade 3 (у тому числі 12 LCNEC і 14 SCLC). У всіх пацієнтів на момент встановлення діагнозу виявлене метастатичне ураження лімфатичних вузлів; віддалені метастази діагностовані у 6 (42,86%) випадках при НЕН легень Grade 2 і у 16 (61,53%) — при Grade 3, зокрема у 6 спостереженнях — множинні. Детальна характеристика вибірки наведена у табл. 3.7.1.

Табл. 3.7.1. Характеристика вибірки при дослідженні PD-L1

Показник		НЕН легень		Загалом 40 (100%) випадків
		Grade 2 (AC) 14 (35%)	Grade 3 (LCNEC і SCLC) 26 (65%)	
Чоловіки		12 (30%)	21 (52,5%)	33 (82,5%)
Жінки		2 (5%)	5 (12,5%)	7 (17,5%)
Вік пацієнтів	≤ 44 роки	2 (5%)	1 (2,5%)	3 (7,5%)
	45–59 років	5 (12,5%)	5 (12,5%)	10 (25%)
	60–74 років	7 (17,5%)	20 (50%)	27 (67,5%)
	≥ 75 років	0	1 (2,5%)	1 (2,5%)
Віддалені метастази		6 (15%)	16 (40%)	22 (55%)
PD-L1, %	група 0 (експресія відсутня)	4 (10%)	7 (17,5%)	11 (27,5%)
	група 1 (1–5%)	5 (12,5%)	14 (35%)	19 (47,5%)
	група 2 (6–20%)	5 (12,5%)	5 (12,5)	10 (25%)
Кі-67, %		5–19% (у середньому 14,7%)	30–100% (у середньому 52,5%)	4–100% (у середньому 39,3%)
Некрози	відсутні	2 (5%)	4 (10%)	6 (15%)
	дрібні вогнища	5 (12,5%)	9 (22,5%)	14 (35%)
	екстенсивні	7 (17,5%)	13 (32,5%)	20 (50%)
Фіброз	відсутній	0	2 (5%)	2 (5%)
	слабкий	8 (20%)	14 (35%)	22 (55%)
	помірний	6 (15%)	10 (25%)	16 (40%)
Лімфоцитарна інфільтрація	не виявлена	5 (12,5%)	3 (7,5%)	8 (20%)
	слабка	8 (20%)	18 (45%)	26 (65%)
	помірна	1 (2,5%)	5 (12,5%)	6 (15%)
Неоангіогенез	не виявлений	2 (5%)	1 (2,5%)	3 (7,5%)
	слабкий	6 (15%)	14 (35%)	20 (50%)
	помірний	6 (15%)	11 (27,5%)	17 (42,5%)

Вибірка була цензурованою. Період спостереження суттєво різнився — від 11 днів до 7,11 років, у середньому 9,71 міс. За даними записів у медичній документації, наприкінці періоду спостереження 21 (51,22%) пацієнт був живий; 19 (47,5%) хворих померли; очікувана тривалість життя у 15 (78,95%) випадках не перевищувала 10,9 міс.

У нашому дослідженні у 29 (72,5%) спостереженнях виявлене слабке або помірно локальне мембранне забарвлення на PD-L1: у 9 (64,29%) зразках АС і у 20 (76,92%) зразках низько диференційованих НЕН легень, зокрема, у 7 (58,33%) LCNEC та у 12 (85,71%) SCLC. 11 (27,5%) зразків НЕН легень виявилися негативним на PD-L1, у тому числі 4 (41,67%) АС і 7 (26,92%) НЕК — відповідно 5 (41,67%) LCNEC і 2 (14,29%) SCLC. У 20 (50%) спостереженнях рівень експресії PD-L1 був у межах 1–5% (група 1): у 5 (35,71%) АС і у 15 (57,69%) зразках НЕН Grade 3 (зокрема, у 5 (41,67%) LCNEC і в 10 (71,43%) SCLC). У 9 (22,5%) випадках виявлена експресія PD-L1 на рівні  $\geq 6\%$ : у 4 (28,57%) АС і у 5 (19,23%) НЕН Grade 3, включаючи 2 (16,67%) зразки LCNEC та 3 (21,43%) SCLC. У нашому дослідженні максимальний рівень експресії PD-L1 дорівнював 20%, його виявляли тільки у зразках LCNEC і SCLC (рис. 3.7.1, 3.7.2).

У нашому дослідженні достовірний зв'язок між рівнями експресії маркерів PD-L1 і Ki-67 не виявлений (рис. 3.7.3).

Також не виявлено значущих відмінностей експресії PD-L1 у НЕН легень Grade 2 і Grade 3 за різної вираженості некрозу, фіброзу, неоангіогенезу та лімфоцитарної інфільтрації.

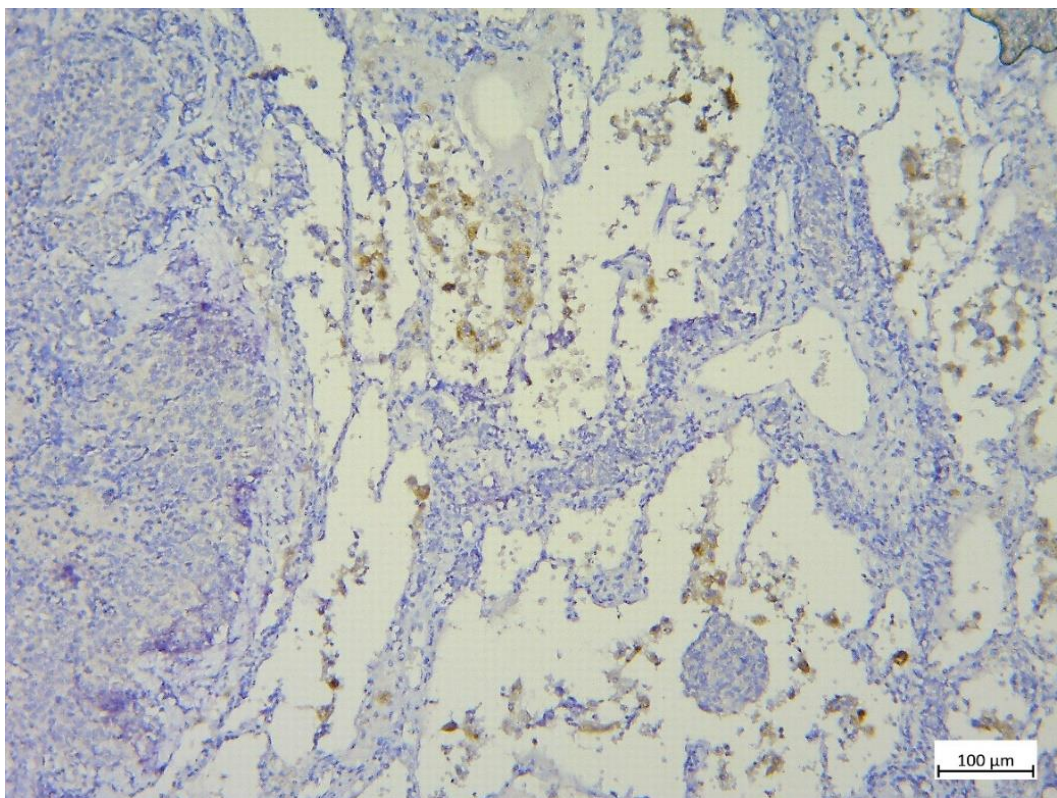


Рис. 3.7.1. Мікрофото. ІГХ-дослідження. Пацієнт, 62 роки, АС (Кі-67=15%), стадія ІІВ. Локальна помірна експресія PD-L1 (12%). 3б.×100.

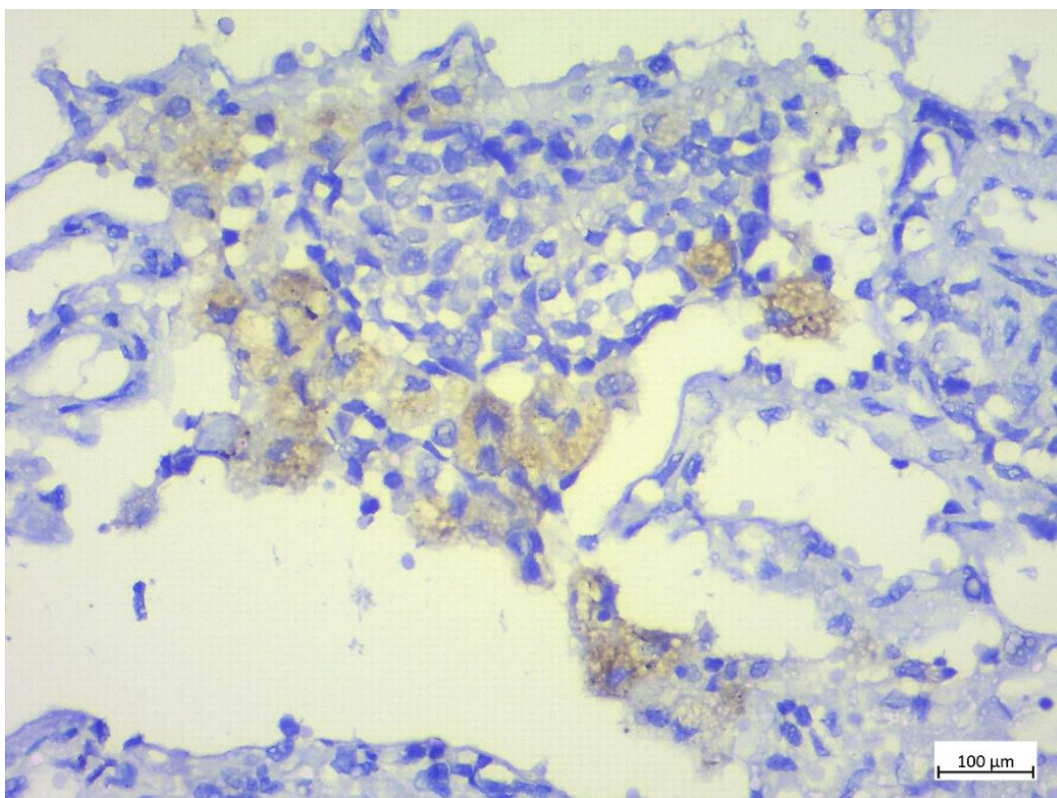


Рис. 3.7.2. Мікрофото. ІГХ-дослідження. Пацієнтка, 63 роки, SCLC (Кі-67=45%), стадія ІVА. Локальна слабка експресія PD-L1 (6%). 3б.×200.



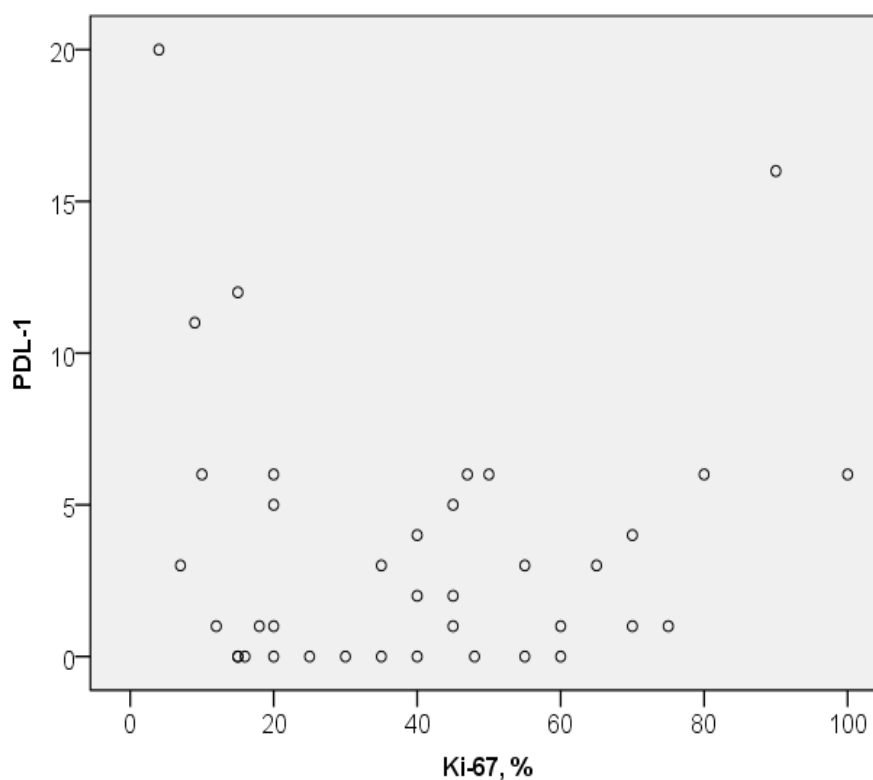


Рис. 3.7.3. Кореляція між рівнями експресії Ki-67 та PD-L1 недостовірна. Метод рангової кореляції Кендала,  $\tau_b=0,042$ ,  $p>0,729$ .

У 5 (38,46%) АС виявлені дрібні поодинокі вогнища некрозу, у 7 (50%) — множинні або протяжні, у 2 (15,38%) зразках некроз відсутній. Великі вогнища некрозу виявлені у 3 (25%) PD-L1-негативних зразках АС, у 2 (16,67%) АС за рівня експресії PD-L1 1–5% та у 2 (16,67%) АС при PD-L1 6–20%. У 13 (50%) випадках НЕН легень Grade 3 були наявні екстенсивні вогнища некрозу, у 9 (34,61%) — дрібні, у 4 (15,38%) некроз не виявлений. У НЕН легень Grade 3 великі вогнища некрозу спостерігали у 2 (7,69%) PD-L1-негативних випадках, у 7 (26,92%) зразках за рівня експресії PD-L1 1–5% та у 4 (15,38%) — при PD-L1 6–20%.

Незначний фіброз виявлений у 20 (50%) випадках, помірний — у 18 (45%). Фіброзні зміни спостерігали в усіх АС та у 24 (93,21%) зразках НЕН Grade 3. Фіброз виявлений у 10 (25%) PD-L1-негативних зразків, у 18 (45%)

випадках за низького рівня експресії PD-L1 (1–5%) та у 10 (25%) — за помірної експресії PD-L1 (6–20%).

Слабка лімфоцитарна інфільтрація виявлена у 26 (65%) спостереженнях, помірна — у 6 (15%). Лімфоцитарна інфільтрація виявлена у 9 (64,29%) зразках АС та у 23 (88,46%) НЕН Grade 3. При цьому 9 (22,5%) зразків були PD-L1-негативними, у 12 (30%) виявлений низький рівень експресії маркеру PD-L1 (1–5%), у 9 (22,5%) — помірний рівень експресії PD-L1 (6–20%).

Ознаки слабого неонгіогенезу виявлені нами у 20 (50%) спостереженнях, помірно вираженого — у 17 (42,5%). Неонгіогенез відзначали у 12 (85,71%) АС та 25 (96,15%) зразках НЕК легень. При цьому 11 (27,5%) зразків НЕН були PD-L1-негативними, у 18 (45%) відзначений низький рівень експресії PD-L1 (1–5%), у 8 (20%) експресія PD-L1 була помірно вираженою (6–20%).

Не виявлено достовірного зв'язку рівнів експресії PD-L1 з жодним з вивчених морфологічних критеріїв, а також з ступенем диференціювання НЕН легень (рис. 3.7.4, А–Е).

Однак середня тривалість життя пацієнтів достовірно різнилася в залежності від рівня експресії PD-L1 (рис. 3.7.5, табл. 3.7.2).

Медіана виживаності хворих достовірно відрізнялася за різних рівнів експресії PD-L1. В групі 0 (PD-L1-негативні зразки НЕН легень) медіана виживаності складала 85,37% міс; в групі 1 (рівень експресії PD-L1 1–5%) вона різко падала до 8 міс., і у групі 2 (рівень експресії PD-L1 6–20%) знову критично знижувалася та не перевищувала 1 міс.

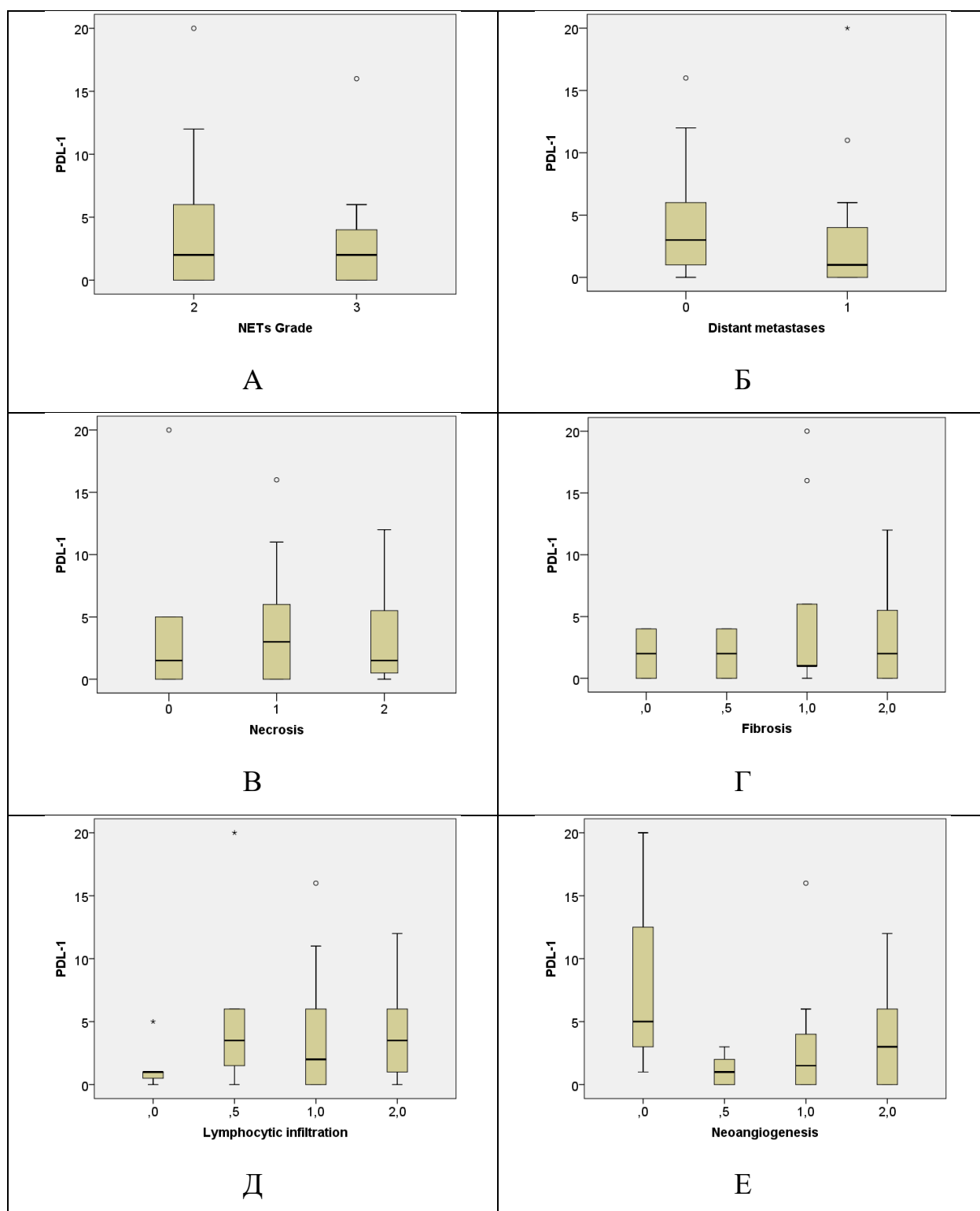


Рис. 3.7.4. Коробковий (box-plot) графік — залежність рівнів експресії маркера PD-L1 від різних морфологічних характеристик НЕН легень.

А — рівень експресії PD-L1 і Grade. Б — рівень експресії PD-L1 і наявність відділених метастазів. В — рівень експресії PD-L1 і некроз (0 — некроз відсутній, 1 — дрібні вогнища некрозу, 2 — великі вогнища

некрозу). Г — рівень експресії PD-L1 та вираженість фіброзу в тканині НЕН легень (0 — фіброз відсутній, 1\* — дуже слабо виражений, 1 — слабкий, 2 — помірний). Д — рівень експресії PD-L1 та лімфоцитарна інфільтрація тканини НЕН легень (0 — лімфоцитарна інфільтрація відсутня, 1\* — дуже слабо виражена, 1 — слабка, 2 — помірна). Е — рівень експресії PD-L1 та неонгіогенез в тканині НЕН легень (0 — неонгіогенез не виявлений, 1\* — дуже слабкий, 1 — слабкий, 2 — помірний). Жирна лінія — медіана, обмежувачі вертикальних ліній — мінімальні і максимальні значення, коло — викиди, зірочки — крайні значення. Застосовані тести Манна–Уїтні та Крускала–Уолліса. В усіх групах порівняння медіанні значення достовірно не відрізнялися.

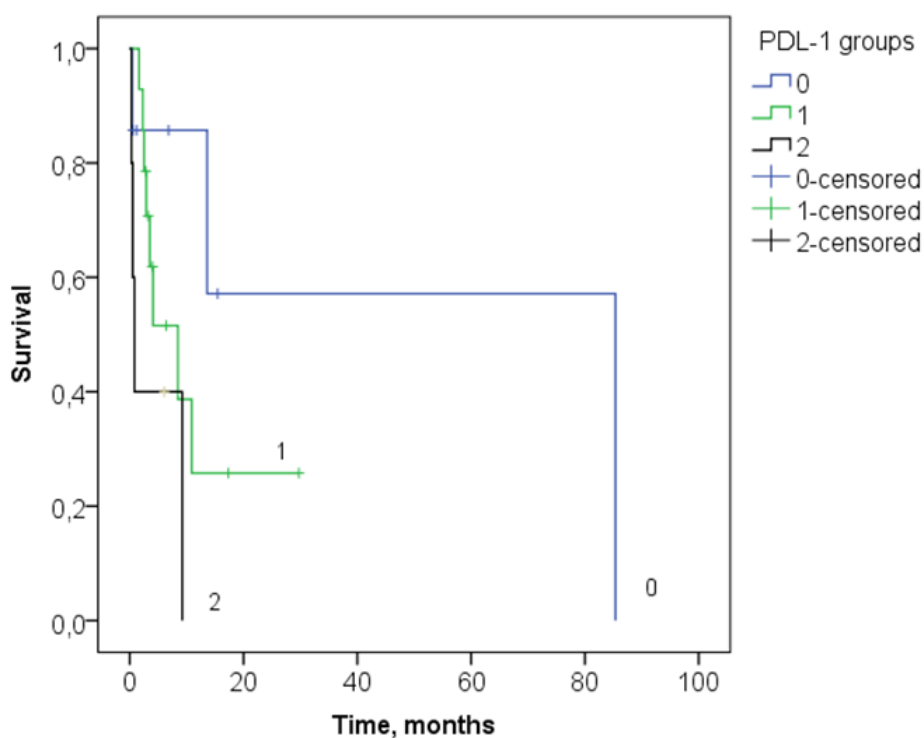


Рис. 3.7.5. Криві виживаності хворих при НЕН легень Grade 3. Група 0 — PD-L1-негативні НЕН; група 1 — слабкий рівень експресії PD-L1 (1–5%); група 2 — помірний рівень експресії PD-L1 (6–20%).

Табл. 3.7.2. Вживаність хворих при НЕН легень достовірно різнилася за різних рівнів експресії PD-L1.

PD-L1	Процентилі					
	25.0%		50.0%		75.0%	
	значення	стандартна помилка	значення	стандартна помилка	значення	стандартна помилка
Група 0 (експресія PD-L1 відсутня)	85,370		85,370		13,600	11,548
Група 1 (PD-L1 1–5%)			8,470	3,346	2,900	0,638
Uhegf 2 (PD-L1 6–20%)	9,230		0,830	0,329	0,530	0,252
Загалом	85,370		9,230	4,212	2,530	0,892

За даними статистичного аналізу, виявлені достовірні відмінності тривалості життя хворих при НЕН легень за різного рівня експресії PD-L1 (Cox-регресія,  $p=0,041$ ). Відношення ризиків 2,47 (95% ДІ 1,04–5,90), тобто при збільшенні номеру групи хворих на 1 одиницю (при порівнянні груп 0 і 1 і /або груп 1 і 2) ризик настання більш ранньої смерті зростав у 2,47 разу; при збільшенні номеру групи на 2 одиниці (при порівнянні групи 0 і 2) — він збільшувався у 6,10 разу. Ймовірність того, що пацієнт групи 1 помре раніше, ніж пацієнт групи 0, становила 71%. Такий саме ризик виявлений і при порівнянні груп 2 і 1. Ймовірність того, що пацієнт групи 2 помре раніше за пацієнта групи 0, становила 86%.

Отже, за даними нашого дослідження не виявлено достовірного зв'язку між рівнем експресії PD-L1 і морфологічними характеристиками НЕН легень (некроз, неоангіогенез, лімфоцитарна інфільтрація), а також з індексом проліферації (Ki-67), ступенем диференціювання пухлини та наявністю

віддалених метастазів. Проте, виявилось, що тривалість життя хворих при НЕН легень Grade 3 без таргетної терапії достовірно залежить від рівня експресії PD-L1. Чим вищим був рівень експресії PD-L1, тим меншою очікувана тривалість життя пацієнта.

Рівень експресії PD-L1 можна вважати додатковим негативним прогностичним фактором при низько диференційованих НЕН легень.

### **Висновки до розділу 3**

Виявлений статистично достовірний зв'язок між вираженістю некрозу та показниками виживаності хворих (Логранк тест,  $p < 0,05$ ). МІ був достовірно пов'язаний з наявністю регіонарних і віддалених метастазів (тест Манна-Уїтні,  $p < 0,01$  і  $p < 0,05$  відповідно), проте, достовірно не впливав на виживаність пацієнтів ( $p = 0,062$ ). Виявлений статистично достовірний прямий зв'язок між МІ, Ki-67 і РННЗ (коефіцієнт кореляції Спірмена  $p < 0,001$ ). Однак, статистично достовірний зв'язок між рівнем експресії Ki-67 і РННЗ відсутній ( $p = 0,217$ ). Всупереч нашим сподіванням, РННЗ не показав себе як чутливий маркер при НЕН легень, за даними нашого дослідження, його експресія не має прогностичного значення.

Рівень експресії Ki-67  $\geq 18\%$  свідчить про поширене ураження лімфатичних вузлів (середостіння, голови та шиї, надключичних, пахвових та інших локалізацій) (ROC-крива, AUC=0,75, специфічність методу — 70%, чутливість — 82,4%), що асоціюється з поганим прогнозом.

Виявлений сильний позитивний зв'язок між експресією ChrA, TTF-1 і СК7, (рангова кореляція Спірмена,  $p < 0,01$ ) та сильний негативний зв'язок між експресією ChrA, Ki-67, екстенсивними некрозами, ступенем диференціювання (НЕН легень ( $p < 0,01$ )). Зниження або зникнення експресії ChrA є достовірним індикатором прогресії пухлини. Експресія решти досліджених ІГХ-маркерів (Syn, CD56, TTF-1, СК7) не мала статистично достовірного прогностичного значення ( $p > 0,05$ ).

Рівень експресії TOP2A достовірно пов'язаний з Ki-67 та наявністю некрозу в тканині НЕН легень (рангова кореляція Спірмена,  $p < 0,01$  і  $p < 0,05$  відповідно), а також має прогностичну цінність (Cox-регресія,  $p < 0,05$ ). Виживаність пацієнтів різнилася за різних рівнів експресії TOP2A (порогове

значення TOP2A 13%) (Логранк-тест,  $p < 0,01$ ): медіана виживаності при TOP2A  $\leq 13\%$  становила 45 міс., тоді як при TOP2A  $> 13\%$  — лише 8 міс.; однорічна виживаність 100% і 39% відповідно.

Нами не виявлено достовірного зв'язку між рівнем експресії PD-L1 і морфологічними характеристиками НЕН легень: індексом проліферації Ki-67, ступенем диференціювання, наявністю віддалених метастазів. Однак, експресія PD-L1 була фактором поганого прогнозу при низько диференційованих агресивних НЕК легень (Grade 3) без таргетної терапії (Cox-регресія,  $p < 0,05$ ).

Таким чином, оцінка експресії ChrA та TOP2A підвищує точність оцінки клінічного перебігу НЕН легень.

Для верифікації ступеня злоякісності та покращення оцінки перебігу НЕН легень ми пропонуємо, крім стандартних морфологічних та ІГХ-критеріїв (некрози, MI, Ki-67) також враховувати відсутність експресії ChrA та рівень експресії TOP2A (див. додаток А).

Результати власних досліджень розділу 3 викладені в статтях [1–6] і апробовані на наукових форумах [7–12]:

1. L.M. Zakhartseva, H.Ye. Chytaieva. Predictive value of morphological features and proliferative markers (mitotic index, Ki-67, PNH3) in bronchopulmonary neuroendocrine tumors. Патологія. 2021, T18, №3(53): 254–262. doi: 10.14739/2310-1237.2021.3.239530. *(Автор здійснила збір матеріалу, разом зі співавтором провела гістологічне дослідження, провела імуногістохімічне дослідження, узагальнила та проаналізувала отримані дані, сформулювала висновки, підготувала статтю до друку).*

2. TOP2A expression as the essential predictive factor in lung neuroendocrine tumors. H.E. Chytaieva, L.M. Zakhartseva. Клінічна онкологія. — 2021, T11, №3–4 (43–44): 1–6. doi: 10.32471/clinicaloncology.2663-466X.43-3.28396. *(Автор провела аналіз літератури, збір матеріалу, разом зі співавтором провела гістологічне дослідження, провела імуногістохімічне дослідження, узагальнила та проаналізувала отримані дані, сформулювала висновки, підготувала статтю до друку).*

3. Chytaieva H., Shkurupii B., Zakhartseva L. Correlation between expression of immunohistochemical markers and morphology in lung neuroendocrine neoplasms. Ukr. Scientific Medical Youth Journal. 2022; 1 (128): 6–18. doi: 10.32345/USMYJ.1(128).2022.6-18. *(Автор здійснила збір матеріалу, разом зі співавторами провела гістологічне та імуногістохімічне дослідження, підготувала ілюстративний матеріал, узагальнила та проаналізувала одержані дані, сформулювала висновки, підготувала статтю до друку).*

4. Рівень експресії Ki-67 як індикатор метастатичного ураження при нейроендокринних новоутвореннях легені. Читаєва Г.С. Клінічна онкологія. — 2022, Т12, №3–4 (47–48): 1–5. doi: 10.32471/clinicaloncology.2663-466X.47-3.29448.

5. Chytaieva H.E., Zakhartseva L.M. PD-L1 expression in bronchopulmonary neuroendocrine tumors: correlation with morphological features and prognosis. Deutscher Wissenschaftsherold. German Science Herald, 2021; 2: 15–23. doi: 10.19221/202123. *(Автор здійснила відбір матеріалу, разом зі співавтором провела гістологічне дослідження, провела імуногістохімічне дослідження, узагальнила та проаналізувала отримані дані, сформулювала висновки, підготувала статтю до друку).*

6. L.M. Zakhartseva, H.E. Chytaieva, O.V. Artemov. Clinical case of non-typical metastasis of neuroendocrine lung carcinoma to the vascular membrane of the eye. Exp. Oncol., 2022; 44 (2): 169–173. doi: 10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-44-no-2.17969. *(Автор здійснила збір матеріалу, підготувала огляд літератури, разом зі співавторами провела гістологічне та імуногістохімічне дослідження, інтерпретацію даних клінічних досліджень, підготувала ілюстративний матеріал, оформила статтю до друку).*

7. G.E. Chitaeva, L.M. Zakhartseva. Anonymous metastases of neuroendocrine tumors: definition of neoplasm's primary location according to morphological study and immuno-staining. Матеріали конф. молодих вчених «Фундаментальна медицина: інтегральні підходи до терапії хворих з



онкопатологією» (м. Київ, 4–5 лютого 2019 р.) (тези). — Онкологія. 2019, Т21, №1:74.

8. Захарцева Л.М., Читаєва Г.Є. Оцінка прогностичної цінності панелі антитіл (хромогранін А, синаптофізин, СК7, СКпан, CD56, TTF-1 та Ki-67) при нейроендокринних пухлинах бронхолегеневої локалізації. Матеріали міжнар. наук.-практ. конф. «Сучасна патоморфологічна діагностика в клінічній практиці лікаря». Вінниця, 10–11 квітня 2019 р. (тези). — Матеріали наук-практ. конф. — Вінниця: Твори, 2019. — С.70–71.

9. Zakhartseva L.M., Chytaieva G.E., Guz' O.O., Zakhartsev Yu.O. Estimation of TTF-1, CK5/6, CK7, CD56, Chromogranin A, and Synaptophysin expression as an auxiliary aspect of neuroendocrine and other non-small cell lung tumors differential diagnosis in small biopsies. (31st European Congress of Pathology in Nice). Nice, France 7–11 September, 2019 (poster). 31st European Congress of Pathology in Nice (Final Programme) — P.101.

10. Читаєва Г.Є., Захарцева Л.М. Экспрессия top2α: дополнительный маркер оценки агрессивности нейроэндокринных опухолей бронхолегочной локализации. Міжнародна медична онлайн конф. «Наукові дослідження патологоанатомів України: досягнення та перспективи розвитку», Київ, 22–23 квітня 2021 р. (тези). — Ukr. Scientific Medical Youth Journal. 2021; suppl. 2(123):37–38.

11. Читаєва Г.Є. Захарцева Л.М. Особливості метастатичного враження при нейроендокринних карциномах легень, морфологічні і імуногістохімічні прогностичні фактор»; IV конф. Укр. дивізіону Інтернаціональної Академії Патології «Сучасна онкопатологія: морфогенез, патоморфологічна діагностика і прогноз пухлин», Запоріжжя, 16 вересня 2021. (усна доповідь); сертифікат учасника.

12. Читаєва Г.Є., Захарцева Л.М. Прогностична цінність морфологічних критеріїв та індексу проліферативної активності (рівень експресії Ki-67) при нейроендокринних пухлинах легень. онлайн конф. «Патологічна анатомія — основа всіх клінічних дисциплін: вимоги

сьогодення». Київ, 18–19 лист., 2021 р. (тези). — Ukr. Scientific Medical Youth Journal. 2021; suppl. 3(126):24–25.

## АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

НЕН легень — досить рідкісні (до 2% в структурі вперше виявленої онкопатології) та гетерогенні пухлини [130, 177, 197]. Але частота їх виявлення за кілька останніх десятиліть хоч і повільно, але невпинно зростає, що вимагає перегляду та оптимізації критеріїв їх діагностики і прогнозу, які можуть бути використані у повсякденній практиці патолога.

За даними літератури, на НЕН легень припадає 22–30% в загальній структурі НЕН (друге місце після ШКТ) і до 20–25% у загальній структурі первинних пухлин легень [20, 42, 43, 84]. Згідно сучасної класифікації НЕН легень представлені 4 гістологічними варіантами: високо диференційованими НЕР (ТС і АС) та низько диференційованими НЕК (LCNEC і SCLC), які вимагають різних терапевтичних підходів [140, 212]. В цілому, для НЕК легень характерна агресивна поведінка, натомість НЕР є більш доброякісними, з кращими показниками виживаності, однак, карциноїди легень також нерідко здатні до метастазування.

Переважає більшість НЕН легень є нефункціональними, клінічні симптоми як правило відсутні або неспецифічні, коректний діагноз нерідко відтермінований, його встановлюють на пізніх стадіях. У понад 40% випадків на момент встановлення діагнозу наявні метастази, що суттєво погіршує прогноз: 5-річна виживаність для IV стадії захворювання не перевищує 5% [84, 217, 233].

Актуальними залишаються питання своєчасної коректної діагностики НЕН легень. Один з ключових моментів — чітке диференціювання НЕН легень низького і високого ступенів злоякісності. ІГХ-дослідження є обов'язковим для сучасного діагностичного алгоритму НЕН легень. Однак, дані літератури щодо експресії різних маркерів досить суперечливі, багато аспектів потребують подальшого вивчення.

З метою більш детального вивчення діагностичних і прогностичних чинників при НЕН легень нами проведено гістологічне та ІГХ дослідження з

використанням біопсійного й операційного матеріалу від 113 пацієнтів, яких лікували у Київському міському онкологічному центрі з 2010 по 2020 р.

За даними літератури, на ТС припадає 9–12% всіх НЕН легень, на LCNEC — 10–15% і на SCLC — до 67–75% [95, 129, 182, 196]. Однак, у нашому дослідженні розподіл гістологічних підтипів НЕН бронхо-легеневої локалізації відрізнявся від загальноприйнятого за рахунок частки AC і SCLC. Так, у нашому дослідженні частка ТС і LCNEC відповідала даним літератури (8% і 17,7% відповідно), натомість AC виявлений у 35,4% випадках, SCLC — у 38,9%. Для цього ми вбачаємо дві причини. Більшість існуючих досліджень при НЕН легень проведені на малих вибірках з огляду на те, що ця патологія є досить рідкісною (у деяких країнах навіть вважається орфанним захворюванням), відповідно, отримані дані нерідко є суперечливими. Крім того, впродовж тривалого часу не було чітких настанов щодо типування різних гістологічних варіантів НЕН легень, класифікації неодноразово і суттєво змінювалися, дослідники використовували різні підходи (МІ, різні порогові значення Ki-67 та навіть модифіковану класифікацію для НЕН ШКТ).

Некроз є обов'язковою ознакою для класифікації НЕН легень, кількість і протяжність вогнищ некрозу збільшується у міру зниження ступеня диференціювання пухлин. Це положення було підтверджено в ході нашого дослідження. Але у 19 (29,7%) випадках НЕК легень (11 SCLC і 8 LCNEC) нами виявлені лише дрібні вогнища некрозу, в 11 (17,2%) спостереженнях (8 SCLC і 3 LCNEC) некроз відсутній. Ймовірна причина полягає в тому, що переважна більшість (понад 60%) таких зразків була представлена малими або краш-біопсіями.

За результатами нашого дослідження, наявність великих за площею некрозів впливала на виживаність хворих. Для груп 0 (некрози відсутні), 1 (дрібні вогнища некрозу) і 2 (великі вогнища некрозу) 75-ий процентіль виживаності складав 14 міс., 8 міс. і 3 міс. відповідно. При розрахунку медіани, процентилів та однорічної виживаності мали на увазі кумулятивну виживаність. По факту, у групі 2 (великі вогнища некрозу) лише 1 пацієнт

прожив 7,08 року (85 міс.). В групі 2 всього був 21 хворий, 11 — померли, але через цензурування на пізніх етапах спостереження, питома вага цього одного випадку виявилася значною. Однорічна виживаність у групі 0 склала 100%, у групі 1 — 67%, і майже впововину менше у групі 2 — 32%. Отже, оцінка некрозів свідчить про прогностичну цінність цього показника при НЕП легень.

Морфологічні характеристики є наріжним каменем у розмежуванні НЕП і НЕК легень; їх поєднання з Ki-67 суттєво покращує точність діагностики, що має важливе клінічне значення. Незважаючи на те, що через неодноразову зміну поглядів на класифікацію НЕН легень порогові рівні експресії Ki-67 «перекривалися» у різних гістологічних підтипах, що спричиняло певну плутанину та розбіжності в їх диференційній діагностиці, цей маркер є «золотим стандартом» ІГХ дослідження. Визначення рівня Ki-67 є достовірнішим і набагато простішим методом, ніж підрахунок МІ, добре відтворюваним і незамінним у разі оцінки малих біопсій (які становлять велику частку матеріалу при НЕН легені) [124].

Але існують деякі неузгодженості, зумовлені кількарізовими змінами термінології та рівнів експресії Ki-67 для розмежування ТС і АС, та особливо АС і низько диференційованих НЕК легені.

Згідно останніх рекомендацій, Ki-67 до 5% відносять до ТС, до 30% — до АС і  $\geq 30\%$  — до LCNEC та SCLC. Але зазвичай SCLC демонструють найвищі показники Ki-67. У нашому дослідженні рівень експресії Ki-67 у LCNEC дорівнював 54,4% (ДІ 95% 45,5–63,2), у SCLC — 63,4% (ДІ 95% 58,5–68,2); у 5 (7,8%) зразках (3 SCLC та 2 LCNEC) Ki-67 сягав 90–100%. Надзвичайно високий рівень експресії Ki-67 характеризує новоутворення з вкрай агресивною поведінкою.

Одним з несприятливих прогностичних чинників при НЕН різних локалізацій є наявність і поширеність метастатичного ураження лімфатичних вузлів [62, 106, 151, 177]. Щонайменше у третини хворих на момент встановлення діагнозу НЕН легені наявні регіонарні метастази, і хоча ТС і АС

вважаються низько і помірно агресивними пухлинами, вони також здатні до метастазування [99, 157, 179].

За даними нашого дослідження, не виявлено статично значущого зв'язку між рівнем експресії Ki-67 та наявністю віддалених метастазів, що може бути зумовлене як невеликим розміром вибірки, так і тим, що навіть при ТС (Ki-67  $\leq 5\%$ ) у хворих виявляли як поодинокі (печінка), так і множинні (контралатеральна легень, головний мозок) віддалені метастази. Однак рівень експресії Ki-67 при НЕН легень може бути використаний як індикатор ймовірного ураження лімфатичних вузлів середостіння, голови та шиї, надключичних, пахвових та інших локалізацій (хороша ROC-крива; AUC 0,75; специфічність методики — 70%, чутливість — 82,4%). Рівень Ki-67  $\geq 18\%$  свідчить про високу ймовірність поширеного ураження лімфатичних вузлів. Визначений нами «критичний» рівень експресії Ki-67  $\geq 18\%$  не є високим і «вкладається» у показники Grade 2 (від 5 до 30%), але має викликати певну настороженість клініцистів щодо ймовірної поширеності патологічного процесу, що зазвичай є свідченням несприятливого прогнозу.

В процесі злоякісної трансформації пухлинні клітини зберігають деякі характеристики, специфічні для первинної локалізації, тож їх можна ідентифікувати за експресією певних ПХ-маркерів.

Позитивна реакція на TTF-1 і CK7 допомагає диференціювати НЕН ШКТ і НЕН легень, різні підтипи останніх експресують різні рівні зазначених маркерів. TTF-1 є більш специфічним для легневих карциноїдів, однак реакція на CK7 була більш стабільною у НЕК легень. У нашому дослідженні 28 (57,1%) НЕН легень були позитивними на TTF-1 і 32 (65,3%) — на CK7. Позитивна реакція на TTF-1 виявлена у 28 (43,8%) зразках НЕК, на CK7 — у 38 (59,4%).

Для встановлення діагнозу НЕН легень, крім характерних морфологічних особливостей, вимагається позитивна реакція хоча б з одним з нейроендокринних маркерів, крім NSE. Зазначається, що 10–20% НЕК експресують лише один нейроендокринний маркер [36, 109]. У нашому

дослідженні було 7 (10,9%) таких спостережень; у більшості випадків LCNEC та SCLC були позитивними за двома нейроендокринними маркерами.

Результати ІГХ-дослідження з кожним з нейроендокринних маркерів варіюють в залежності від гістологічного підтипу НЕН легень, кількість позитивних реакцій знижується у низько диференційованих НЕК. У нашому дослідженні експресія ChrA знижувалася і досить швидко зникала у міру прогресування пухлини, натомість багато високо злоякісних НЕН легень демонстрували позитивне забарвлення на Syn і CD56. CD56 був важливим маркером для підтвердження діагнозу при низько диференційованих НЕК легень, що втратили здатність експресувати інші нейроендокринні маркери. Експресія CD56 виявлена нами у 18 зразках, з них 7 (38,9%) (6 SCLC і 11 LCNEC) були негативними на ChrA і Syn. Ймовірно, коректніше вважати CD56 індикатором SCLC, а не загальним нейроендокринним маркером.

За результатами нашого дослідження, кореляція експресії ІГХ-маркерів з некрозом, індексом проліферації (Ki-67) і ступенем диференціювання НЕН легень була достовірною тільки для ChrA (рангова кореляція Спірмена,  $p < 0,01$ ). Решта протестованих варіантів по інших біомаркерах не були статистично значущими. Зниження або втрата експресії ChrA є надійним свідченням на користь прогресії пухлини. Рівень експресії ChrA може бути використаний як додатковий інструмент грейдінгу НЕН легень.

У нашому дослідженні ми оцінювали найбільш значущі морфологічні параметри, мітотичну активність, Ki-67 та експресію додаткових маркерів проліферації PNH3 і TOP2A для максимально коректної діагностики та прогнозування НЕН легень.

Зазвичай у рутинній практиці мітози оцінюють не дуже акуратно. Визначення МІ вимагає від дослідника багато часу та певного досвіду. До того ж, результати підрахунку не завжди є надійними, оскільки візуально мітози інколи можна сплутати з апоптотичними тільцями, макрофагами тощо. І досить складно оцінити МІ у малих біопсіях [194, 235].

У НЕП легень МІ суттєво коливався — від 0,1 до 8,1 у типових карциноїдах, і від 0,1 до 11,4 — у НЕП Grade 3. Найбільшу кількість мітозів (у т.ч. числі патологічних, часто з розсіюванням) виявлено у LCNEC, МІ був досить високим — до 11,4, що збігається з даними інших досліджень [49]. Отже, варто одночасно оцінювати мітози і некрози у НЕП легень: один з показників достовірно пов'язаний з наявністю метастазів, інший — з показниками виживаності.

РННЗ — мітозо-специфічний маркер, його цінність вивчали у кількох типах пухлин [228]. РННЗ забарвлює клітини в мітозі, спрощує та прискорює оцінку проліферації, звертаючи увагу патолога на мітотично активні ділянки [56]. Використання цього маркеру спрощує і прискорює дослідження, покращує відтворюваність результатів при оцінці мітотичної активності різними дослідниками. У нашому дослідженні проведено 64 ІГХ-реакції на РННЗ, виявлений статистично достовірний зв'язок між РННЗ і МІ. Але, всупереч даним літератури та нашим сподіванням, не виявлено статистично достовірного зв'язку між рівнем експресії РННЗ і некрозами, метастазами та виживаністю. Можливо, це спричинене використанням різних методів оцінки експресії РННЗ у різних дослідженнях. Також на отримані результати могли вплинути певні обмеження даного дослідження: невелика вибірка, частка різних підтипів НЕП легень, включених у дослідження. Однак, при НЕП легень слід брати до уваги інші надійні діагностична та прогностичні чинники.

У нашому дослідженні МІ був достовірно пов'язаний з рівнями експресії Ki-67 і РННЗ ( $p < 0,001$ ), а також з метастатичними ураженнями ( $p < 0,003$ ), але не з виживаністю пацієнтів.

В цілому, Ki-67 продемонстрував набагато кращі результати, ніж РННЗ. Але у даному дослідженні не виявлено достовірного зв'язку між рівнем експресії Ki-67 і РННЗ, морфологічними особливостями новоутворення, прогресуванням захворювання та прогнозом.

Нами вивчений додатковий маркер проліферації клітин пухлини — TOP2A (50 реакцій), експресія якого тісно пов'язана з біологією пухлини та її



клінічним перебігом. TOP2A не є новим маркером у дослідженнях з онкопатології, але більшість з них зосереджені на його потенційній прогностичній цінності [5, 122]. Були декілька спроб використати TOP2A для прогнозування перебігу захворювання (наявність метастазів) або виживаності при різних видах раку, але результати досліджень виявилися досить суперечливими. Однією з причин може бути різна прогностична цінність TOP2A у різних типах раку. Друга причина зумовлена використанням різних методів для визначення TOP2-статусу (зазвичай це ІГХ і FISH) з поганою узгодженістю результатів дослідження [5, 142]. На сьогоднішній день ІГХ широко використовують для виявлення експресії TOP2A. Однак, дотепер немає стандартних рекомендацій щодо використання певних антитіл, процедури забарвлення та систем оцінки. У різних дослідженнях використовуються різні порогові значення: 5%, 10%, 15%, 20 і 30% [5]. У нашому дослідженні показники експресії TOP2A були досить гетерогенними і варіювали від 0 до 85%; TOP2A  $\geq$ 5% вважали позитивним результатом (38 (76%) випадків); TOP2A  $\geq$ 35% — гіперекспресією (10 (20%) спостережень).

Наше дослідження показало, що TOP2A значною мірою пов'язаний з високим показником Ki-67, що дозволяє припустити більшу агресивність таких НЕН легень. Всі випадки гіперекспресії TOP2A ( $\geq$ 35%) відповідали низько диференційованим НЕК легень, при цьому Ki-67 становив у середньому 57% (ДІ 95% 35–79). Експресія TOP2A, на відміну від Ki-67, була достовірно пов'язана не тільки з наявністю некрозу, а і з його вираженістю, а також з метастатичним ураженням лімфатичних вузлів, що вважається несприятливим прогностичним чинником при НЕН легень [25].

Нами виявлена прогностична значущість підвищеного рівня експресії TOP2A щодо збільшення частоти регіонарних метастазів та зменшення тривалості життя хворих (хороша ROC-крива (AUC=0,73; ДІ 95% 0,558–0,901). При TOP2A <13% метастатичне ураження лімфатичних вузлів було нетиповим, медіанна виживаність становила 45 міс., 1-річна виживаність сягала 100%. Натомість рівень експресії TOPA >13% був прогностичним

чинником щодо метастатичного ураження лімфатичних вузлів на момент встановлення діагнозу НЕН легень і несприятливого прогнозу: загальна виживаність становила 8 міс., 1-рвчна виживаність не перевищувала 39%. Отримані нами дані свідчать про те, що TOP2A — чутливий маркер і може бути використаний в якості додаткового критерія, що свідчить про метастатичне ураження лімфатичних вузлів при НЕН легень. TOP2A можна розглядати як додатковий прогностичний фактор: більш високі його показники пов'язані з поганою виживаністю пацієнтів.

Висока агресивність новоутворення і поганий прогноз пов'язані не тільки з підвищенням проліферативної активності клітин пухлини, а й з їх здатністю уникати імунного контролю. За даними літератури, експресія PD-L1 вважається негативним прогностичним чинником у багатьох агресивних пухлинах [208, 216]. Однак, ці дані потребують уточнення, зокрема, у випадку НЕН. Більшість злоякісних новоутворень експресують PD-L1 у невеликій кількості спостережень [177, 229]. У нашому дослідженні, на невеликій вибірці (40 реакцій) PD-L1-позитивними виявилися 10 (25%) зразків НЕН легень Grade 2 і 19 (47,5%) Grade 3, у переважній більшості випадків реакція була локальною слабкою або помірно вираженою. Рівень експресії PD-L1 в межах 1–5% вважали низьким,  $\geq 6\%$  — помірним. Максимальний рівень експресії PD-L1 у нашому дослідженні 20%.

За даними статистичного аналізу не виявлено достовірного зв'язку рівнів експресії PD-L1 з жодним з вивчених морфологічних критеріїв: ступенем диференціювання НЕН легень, некрозом, лімфоцитарною інфільтрацією, фіброзом, неоангіогенезом, а також наявністю віддалених метастазів і індексом проліферації (Ki-67).

Однак, виявлений достовірний зв'язок між рівнем експресії PD-L1 та очікуваною тривалістю життя при НЕН легень Grade 3 без таргетної терапії. Медіана виживаності пацієнтів суттєво різнилася за різних рівнів експресії PD-L1. У PD-L1-негативних випадках вона дорівнювала 85 міс., при PD-L1 1–5% (низький рівень експресії) — 8 міс., при PD-L1 6–20% (помірна експресія)

різко знижувалася до 0,8 міс. Ймовірність настання більш ранньої смерті становила 70% при порівнянні виживаності пацієнтів груп 0 (PD-L1-негативні випадки) і 1 (PD-L1 1–5%), а також груп 1 і 2 (PD-L1 6–20%). Але ймовірність того, що хворий групи 2 (PD-L1 6–20%) помре раніше, ніж пацієнт групи 0 (експресія PD-L1 відсутня) перевищувала 80%.

Таким чином, рівень експресії PD-L1 може бути використаний як додатковий негативний прогностичний чинник у хворих при НЕН легень Grade 3 без таргетної терапії.

## ВИСНОВКИ

1. Нейроендокринні новоутворення легень в загальній структурі нейроендокринних пухлин склали 37,4% з тенденцією до зростання за період спостереження (2010–2020 рр.) і переважанню низько (56,7%) і помірно диференційованих (35,4%) варіантів. На момент встановлення діагнозу регіонарні метастази виявлені у 65,49% хворих, віддалені — у 38,05%.
2. Серед морфологічних особливостей статистично достовірне прогностичне значення мали наявність некрозу та мітотичний індекс. Некрози в нейроендокринних новоутвореннях легень показали пряму кореляцію з показниками виживаності пацієнтів (Логранк тест,  $p < 0,05$ ). Мітотичний індекс був достовірно пов'язаний з наявністю регіонарних і віддалених метастазів (тест Манна-Уїтні,  $p < 0,01$  і  $p < 0,05$  відповідно), але достовірно не впливав на виживаність хворих ( $p = 0,062$ ).
3. Виявлений статистично достовірний прямий зв'язок між мітотичним індексом і рівнем експресії Ki-67 і РННЗ (коефіцієнт кореляції Спірмена  $p < 0,001$ ). Однак, статистично достовірний зв'язок між рівнем експресії Ki-67 і РННЗ відсутній ( $p = 0,217$ ).
4. Рівень експресії Ki-67  $\geq 18\%$  свідчить про поширене ураження лімфатичних вузлів (середостіння, голови та шиї, надключичних, пахвових та інших локалізацій) (ROC-крива, AUC=0,75, специфічність методу — 70%, чутливість — 82,4%).
5. Виявлений сильний позитивний зв'язок між експресією ChrA, TTF-1 і CK7, (рангова кореляція Спірмена,  $p < 0,01$ ) та сильний негативний зв'язок між експресією ChrA, наявністю і поширеністю вогнищ некрозу, ступенем диференціювання (Grade) нейроендокринних новоутворень легень, індексом проліферації Ki-67 ( $p < 0,01$ ). Зниження

або зникнення експресії ChrA є достовірним індикатором прогресії пухлини.

6. Рівень експресії TOP2A достовірно пов'язаний з наявністю некрозу в тканині нейроендокринних новоутворень легень та індексом проліферації Ki-67 (рангова кореляція Спірмена,  $p < 0,05$  і  $p < 0,01$  відповідно), а також має прогностичну цінність (Cox-регресія,  $p < 0,05$ ). Вживаність пацієнтів різнилася за різних рівнів експресії TOP2A (порогове значення TOP2A 13%) (Логранк-тест,  $p < 0,01$ ): медіана виживаності при TOP2A  $\leq 13\%$  становила 45 міс., при TOP2A  $> 13\%$  — лише 8 міс.; однорічна виживаність 100% і 39% відповідно.
7. Не виявлено достовірного зв'язку між рівнем експресії PD-L1 і морфологічними характеристиками нейроендокринних новоутворень легень: індексом проліферації Ki-67, ступенем диференціювання (Grade), наявністю віддалених метастазів. Однак, експресія PD-L1 виявилася негативним прогностичним фактором у хворих при низько диференційованих НЕК легень (Grade 3) без таргетної терапії (Cox-регресія,  $p < 0,05$ ).
8. Пропонуємо для верифікації нейроендокринних новоутворень легень до стандартних морфо-імуногістохімічних прогностичних показників (наявність некрозів, мітотичний індекс, експресія Ki-67) додати відсутність експресії ChrA, та експресію TOP2A, що підвищує точність оцінки клінічного перебігу агресивних атипових карциноїдів та нейроендокринних карцином легень.

## ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Коректна діагностика та визначення прогнозу при нейроендокринних новоутвореннях легень потребує комплексної оцінки морфологічних критеріїв та імуногістохімічного профілю.
2. На момент встановлення діагнозу нейроендокринного новоутворення легень рівень експресії Ki-67  $\geq 18\%$  «вкладається» у Grade 2 (від 5 до 30%, відповідає атиповому карциноїду), але має насторожити клініцистів, оскільки свідчить про численні метастатичні ураження лімфатичних вузлів, що є свідченням несприятливого прогнозу.
3. ChrA може бути використаний як додатковий інструмент для оцінки ступеня диференціації (грейдингу) нейроендокринних новоутворень легень. Зниження або втрата експресії ChrA є достовірним свідченням прогресії пухлини.
4. TOP2A — чутливий маркер, може бути використаний в якості додаткового критерія, що свідчить про метастатичне ураження лімфатичних вузлів при нейроендокринних новоутвореннях легень. TOP2A є додатковим прогностичним фактором: більш високі його показники ( $>13\%$ ) асоційовані з поганою виживаністю пацієнтів.
5. У випадку низько диференційованих нейроендокринних карцином легень (LCNEC, SCLC) експресія PD-L1 є маркером критичного скорочення очікуваної тривалості життя пацієнтів без імунотерапії.

**СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ**

1. AJCC Cancer Staging Manual. Springer; 2017.
2. Alexandraki KI, Tsoli M, Kyriakopoulos G, Angelousi A, Nikolopoulos G, Kolomodi D, et al. Current concepts in the diagnosis and management of neuroendocrine neoplasms of unknown primary origin. *Minerva Endocrinol* [Internet]. 2020;44(4). Available from: <http://dx.doi.org/10.23736/s0391-1977.19.03012-8>
3. Allen R. Orbital metastases: When to suspect? When to biopsy? *Middle East Afr J Ophthalmol* [Internet]. 2018;25(2):60. Available from: [http://dx.doi.org/10.4103/meajo.meajo\\_93\\_18](http://dx.doi.org/10.4103/meajo.meajo_93_18)
4. Alsaab HO, Sau S, Alzhrani R, Tatiparti K, Bhise K, Kashaw SK, et al. PD-1 and PD-L1 checkpoint signaling inhibition for cancer immunotherapy: Mechanism, combinations, and clinical outcome. *Front Pharmacol* [Internet]. 2017;8. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2017.00561>
5. An X, Xu F, Luo R, Zheng Q, Lu J, Yang Y, et al. The prognostic significance of topoisomerase II alpha protein in early stage luminal breast cancer. *BMC Cancer* [Internet]. 2018;18(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12885-018-4170-7>
6. Andrini E, Marchese PV, De Biase D, Mosconi C, Siepe G, Panzuto F, et al. Large cell neuroendocrine carcinoma of the lung: Current understanding and challenges. *J Clin Med* [Internet]. 2022;11(5):1461. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/jcm11051461>
7. Assi HA, Padda SK. Latest advances in management of small cell lung cancer and other neuroendocrine tumors of the lung. *Cancer Treat Res Commun* [Internet]. 2020;23(100167):100167. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctarc.2020.100167>
8. Baine MK, Rekhman N. Multiple faces of pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma: update with a focus on practical approach to

- diagnosis. *Transl Lung Cancer Res* [Internet]. 2020;9(3):860–78. Available from: <http://dx.doi.org/10.21037/tlcr.2020.02.13>
9. Basuroy R, Bouvier C, Ramage JK, Sissons M, Srirajaskanthan R. Delays and routes to diagnosis of neuroendocrine tumours. *BMC Cancer* [Internet]. 2018;18(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12885-018-5057-3>
  10. Baxi AJ, Chintapalli K, Katkar A, Restrepo CS, Betancourt SL, Sunnapwar A. Multimodality imaging findings in carcinoid tumors: A head-to-toe spectrum. *Radiographics* [Internet]. 2017;37(2):516–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1148/rg.2017160113>
  11. Bayraktar S, Batoos S, Okuno S, Glück S. Immunotherapy in breast cancer. *J Carcinog* [Internet]. 2019;18(1):2. Available from: [http://dx.doi.org/10.4103/jcar.jcar\\_2\\_19](http://dx.doi.org/10.4103/jcar.jcar_2_19)
  12. Bellizzi AM. Immunohistochemistry in the diagnosis and classification of neuroendocrine neoplasms: what can brown do for you? *Hum Pathol* [Internet]. 2020;96:8–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2019.12.002>
  13. Berner AM, Pipinikas C, Ryan A, Dibra H, Moghul I, Webster A, et al. Diagnostic approaches to neuroendocrine neoplasms of unknown primary site. *Neuroendocrinology* [Internet]. 2020;110(7–8):563–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1159/000504370>
  14. Bertino EM, Confer PD, Colonna JE, Ross P, Otterson GA. Pulmonary neuroendocrine/carcinoid tumors: A review article. *Cancer* [Internet]. 2009;115(19):4434–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/cncr.24498>
  15. Boland JM, Kroneman TN, Jenkins SM, Terra SBSP, Xie H, Molina J, et al. Ki-67 labeling index in pulmonary carcinoid tumors: Comparison between small biopsy and resection using tumor tracing and Hot Spot methods. *Arch Pathol Lab Med* [Internet]. 2020;144(8):982–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.5858/arpa.2019-0374-oa>



16. Borczuk AC. Pulmonary neuroendocrine tumors. *Surg Pathol Clin* [Internet]. 2020;13(1):35–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.path.2019.10.002>
17. Boutrid H, Kassem M, Tozbikian G, Morgan E, White J, Shah M, et al. TTF-1 positive primary small cell carcinoma of the breast: A case report and review of the literature. *Front Endocrinol (Lausanne)* [Internet]. 2020;11. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fendo.2020.00228>
18. Branchfield K, Nantie L, Verheyden JM, Sui P, Wienhold MD, Sun X. Pulmonary neuroendocrine cells function as airway sensors to control lung immune response. *Science* [Internet]. 2016;351(6274):707–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1126/science.aad7969>
19. Breitling LP, Rinke A, Gress TM. Recent survival trends in high-grade neuroendocrine neoplasms and lung cancer. *Neuroendocrinology* [Internet]. 2020;110(3–4):225–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1159/000500883>
20. Broder MS, Cai B, Chang E, Neary MP. Incidence and prevalence of neuroendocrine tumors of the lung: analysis of a US commercial insurance claims database. *BMC Pulm Med* [Internet]. 2018;18(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12890-018-0678-5>
21. Burke A, Stashek K. Neuroendocrine neoplasms of the lung. *AJSP Rev Rep* [Internet]. 2021;26(3):175–87. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/pcr.0000000000000445>
22. Cadioli A, Rossi G, Costantini M, Cavazza A, Migaldi M, Colby TV. Lung cancer histologic and immunohistochemical heterogeneity in the era of molecular therapies: Analysis of 172 consecutive surgically resected, entirely sampled pulmonary carcinomas. *Am J Surg Pathol* [Internet]. 2014;38(4):502–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/pas.0000000000000154>
23. Cai H, Shao B, Zhou Y, Chen Z. High expression of TOP2AA in hepatocellular carcinoma is associated with disease progression and poor

- prognosis. *Oncology Letters* [Internet]. 2020;20(5). Available from: <http://dx.doi.org/10.3892/ol.2020.12095>
24. Cai Y-C, Banner B, Glickman J, Odze RD. Cytokeratin 7 and 20 and thyroid transcription factor 1 can help distinguish pulmonary from gastrointestinal carcinoid and pancreatic endocrine tumors. *Hum Pathol* [Internet]. 2001;32(10):1087–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/hupa.2001.28245>
25. Cardillo G, Sera F, Martino M. Bronchial carcinoid tumors: nodal status and long-term survival after resection. *The Annals of thoracic*. 2004.
26. Casey RT, Valk GD, Schalin-Jäntti C, Grossman AB, Thakker RV. ENDOCRINOLOGY IN THE TIME OF COVID-19: Clinical management of neuroendocrine neoplasms (NENs). *Eur J Endocrinol* [Internet]. 2020;183(2):G79–88. Available from: <http://dx.doi.org/10.1530/eje-20-0424>
27. Casteillo F, Fournel P, Da Cruz V, Karpathiou G, Boutet C, Jacquin J-P, et al. TTF-1-positive metastatic endometrioid carcinoma: A case report and review of literature of a potential diagnostic pitfall. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* [Internet]. 2020;28(1):e6–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/pai.0000000000000539>
28. Champaneria MC, Modlin IM, Kidd M, Eick GN. Friedrich Feyrter: A precise intellect in a diffuse system. *Neuroendocrinology* [Internet]. 2006;83(5–6):394–404. Available from: <http://dx.doi.org/10.1159/000096050>
29. Chan DL, Clarke SJ, Diakos CI, Roach PJ, Bailey DL, Singh S, et al. Prognostic and predictive biomarkers in neuroendocrine tumours. *Crit Rev Oncol Hematol* [Internet]. 2017;113:268–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.03.017>
30. Chan JM, Quintanal-Villalonga Á, Gao VR, Xie Y, Allaj V, Chaudhary O, et al. Signatures of plasticity, metastasis, and immunosuppression in an atlas of human small cell lung cancer. *Cancer Cell* [Internet]. 2021;39(11):1479–1496.e18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccell.2021.09.008>

31. Chee J, Robinson BWS, Holt RA, Creaney J. Immunotherapy for lung malignancies. *Chest* [Internet]. 2017;151(4):891–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chest.2016.10.007>
32. Chen H-F, Wang W-X, Li X-F, Wu L-X, Zhu Y-C, Du K-Q, et al. Eye metastasis in lung adenocarcinoma mimicking anterior scleritis: A case report. *World J Clin Cases* [Internet]. 2020;8(2):410–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.12998/wjcc.v8.i2.410>
33. Chen T, Sun Y, Ji P, Kopetz S, Zhang W. Topoisomerase II $\alpha$  in chromosome instability and personalized cancer therapy. *Oncogene* [Internet]. 2015;34(31):4019–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2014.332>
34. Chen X, Huang Y, Chen F, She H, Chen X. Risk factors and prognostic factors for pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma with brain metastasis. *Cancer Med* [Internet]. 2023;12(4):4087–99. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/cam4.5267>
35. Chiriac LR. Tumor cell proliferation, proliferative index and mitotic count in lung cancer. *Transl Lung Cancer Res* [Internet]. 2016;5(5):554–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.21037/tlcr.2016.10.10>
36. Ciobanu O, Martin S, Fica S. Perspectives on the diagnostic, predictive and prognostic markers of neuroendocrine neoplasms (Review). *Exp Ther Med* [Internet]. 2021;22(6). Available from: <http://dx.doi.org/10.3892/etm.2021.10914>
37. Cives M, Strosberg JR. Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2018;68(6):471–87. Available from: <http://dx.doi.org/10.3322/caac.21493>
38. Constantinidou A, Alifieris C, Trafalis DT. Targeting Programmed Cell Death -1 (PD-1) and Ligand (PD-L1): A new era in cancer active immunotherapy. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2019;194:84–106. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.09.008>

39. Cros J, Théou-Anton N, Gounant V, Nicolle R, Reyes C, Humez S, et al. Specific genomic alterations in high-grade pulmonary neuroendocrine tumours with carcinoid morphology. *Neuroendocrinology* [Internet]. 2021;111(1–2):158–69. Available from: <http://dx.doi.org/10.1159/000506292>
40. d’Herbomez M, Coppin L, Bauters C, Rouaix-Emery N, Carnaille B, Do Cao C. Biomarkers of neuroendocrine tumors. *Ann Biol Clin (Paris)* [Internet]. 2016;74(6):669–79. Available from: <http://dx.doi.org/10.1684/abc.2016.1188>
41. Da Silva Correia S, Pinto C, Bernardo J. Pulmonary carcinoid: analysis of a single institutional experience and prognostic factors. *Acta Med Port.* 2014;27(6):749–54.
42. Darbà J, Marsà A. Exploring the current status of neuroendocrine tumours: a population-based analysis of epidemiology, management and use of resources. *BMC Cancer* [Internet]. 2019;19(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12885-019-6412-8>
43. Das S, Dasari A. Epidemiology, incidence, and prevalence of neuroendocrine neoplasms: Are there global differences? *Curr Oncol Rep* [Internet]. 2021;23(4). Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s11912-021-01029-7>
44. Dasari A, Shen C, Halperin D, Zhao B, Zhou S, Xu Y, et al. Trends in the incidence, prevalence, and survival outcomes in patients with neuroendocrine tumors in the United States. *JAMA Oncol* [Internet]. 2017;3(10):1335. Available from: <http://dx.doi.org/10.1001/jamaoncol.2017.0589>
45. de Herder WW, Rehfeld JF, Kidd M, Modlin IM. A short history of neuroendocrine tumours and their peptide hormones. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2016;30(1):3–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.beem.2015.10.004>
46. Delektorskaya VV. Neuroendocrine tumors of the lung: the current classification and pathology diagnosis algorithm. *Adv Mol Oncol* [Internet]. 2017;4(2):46–58. Available from: <http://dx.doi.org/10.17650/2313-805x-2017-4-2-46-58>

47. DeMarinis A, Malik F, Matin T, Rahmany Z, Putnam T, Nfonoyim J. A rare case of metastatic small cell neuroendocrine carcinoma of the lung presenting as isolated thrombocytopenia. *J Community Hosp Intern Med Perspect* [Internet]. 2019;9(4):327–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/20009666.2019.1644916>
48. Derks JL, Rijnsburger N, Hermans BCM, Moonen L, Hillen LM, von der Thüsen JH, et al. Clinical-pathologic challenges in the classification of pulmonary neuroendocrine neoplasms and targets on the horizon for future clinical practice. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2021;16(10):1632–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtho.2021.05.020>
49. Derks JL, Speel E-JM, Thunnissen E, van Suylen RJ, Buikhuisen WA, van Velthuysen M-LF, et al. Neuroendocrine cancer of the lung: A diagnostic puzzle. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2016;11(3):e35–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtho.2015.10.013>
50. Di Giacinto P, Rota F, Rizza L, Campana D, Isidori A, Lania A, et al. Chromogranin A: From laboratory to clinical aspects of patients with neuroendocrine tumors. *Int J Endocrinol* [Internet]. 2018;2018:1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2018/8126087>
51. Dum D, Menz A, Völkel C, De Wispelaere N, Hinsch A, Gorbokon N, et al. Cytokeratin 7 and cytokeratin 20 expression in cancer: A tissue microarray study on 15,424 cancers. *Exp Mol Pathol* [Internet]. 2022;126(104762):104762. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexmp.2022.104762>
52. Dumoulin DW, Aarts MJ, De Ruyscher D, Aerts JGJV, Dingemans A-MC. Trends in the epidemiology of small-cell lung cancer: a Dutch nationwide population-based study over 1989–2020. *Eur J Cancer* [Internet]. 2023;191(112985):112985. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2023.112985>
53. Duregon E, Bertero L, Pittaro A, Soffietti R, Rudà R, Trevisan M, et al. Ki-67 proliferation index but not mitotic thresholds integrates the molecular

- prognostic stratification of lower grade gliomas. *Oncotarget* [Internet]. 2016;7(16):21190–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.8498>
54. Elbakary MA, Eldesouky MA. Clinical and imaging characteristics of orbital metastatic lesions among Egyptian patients. *Clin Ophthalmol* [Internet]. 2015;1683. Available from: <http://dx.doi.org/10.2147/opth.s87788>
55. Elmaci A, Altinoz MA, Bolukbasi FH, Yapicier O, Sav A. Paradoxical results obtained with Ki67-labeling and PHH3-mitosis index in glial tumors: a literature analysis. *Clin Neuropathol* [Internet]. 2017;36(11):272–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.5414/np301028>
56. Elmaci I, Altinoz MA, Sari R, Bolukbasi FH. Phosphorylated histone H3 (PHH3) as a novel cell proliferation marker and prognosticator for meningeal tumors: A short review. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* [Internet]. 2018;26(9):627–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/pai.0000000000000499>
57. *Endocrine Biomarkers*. Elsevier; 2017.
58. Erdogdu IH. MHC class 1 and PDL-1 status of primary tumor and lymph node metastatic tumor tissue in gastric cancers. *Gastroenterol Res Pract* [Internet]. 2019;2019:1–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2019/4785098>
59. Esposito G, Palumbo G, Carillio G, Manzo A, Montanino A, Sforza V, et al. Immunotherapy in small cell lung cancer. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2020;12(9):2522. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/cancers12092522>
60. Farrag M, Ibrahim E, Abdelwahab H, Elsergany A, Elhadidy T. PDL-1 expression in lung carcinoma and its correlation with clinicopathological and prognostic characteristics. *J Immunoassay Immunochem* [Internet]. 2021;42(6):679–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/15321819.2021.1938606>
61. Fazio N, Gervaso L, Halfdanarson TR, La Salvia A, Hofland J, Hernando J, et al. Coronavirus disease 2019 in patients with neuroendocrine neoplasms: Preliminary results of the INTENSIVE study. *Eur J Cancer* [Internet].

- 2021;154:246–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2021.06.029>
62. Fei F, Li C, Cao Y, Liu K, Du J, Gu Y, et al. CK7 expression associates with the location, differentiation, lymph node metastasis, and the Dukes' stage of primary colorectal cancers. *J Cancer* [Internet]. 2019;10(11):2510–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.7150/jca.29397>
63. Ferrara MG, Stefani A, Simbolo M, Pilotto S, Martini M, Lococo F, et al. Large cell neuro-endocrine carcinoma of the lung: Current treatment options and potential future opportunities. *Front Oncol* [Internet]. 2021;11. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2021.650293>
64. Filosso PL, the ESTS Lung Neuroendocrine Working-Group Participating Centers, Falcoz PE, Solidoro P, Pellicano D, Passani S, et al. The European Society of Thoracic Surgeons (ESTS) lung neuroendocrine tumors (NETs) database. *J Thorac Dis* [Internet]. 2018;10(S29):S3528–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.21037/jtd.2018.04.104>
65. Fisseler-Eckhoff A, Demes M. Neuroendocrine tumors of the lung. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2012;4(3):777–98. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/cancers4030777>
66. Foo FY, Lee M, Looi A. Asymptomatic pancreatic adenocarcinoma presenting as an orbital metastatic tumor. *Orbit* [Internet]. 2010;29(5):262–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.3109/01676830.2010.485719>
67. Gálffy G. Diagnosis and treatment of the neuroendocrine tumors of the lung. *Magy Onkol*. 2018;62(2):113–8.
68. Garassino MC, Whisenant JG, Huang L-C, Trama A, Torri V, Agustoni F, et al. COVID-19 in patients with thoracic malignancies (TERAVOLT): first results of an international, registry-based, cohort study. *Lancet Oncol* [Internet]. 2020;21(7):914–22. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s1470-2045\(20\)30314-4](http://dx.doi.org/10.1016/s1470-2045(20)30314-4)
69. Garcia de de Jesus K, Gupta S, Cisneros O, Hoque MR, Vigoda I. A fatal case of large cell neuroendocrine lung cancer metastatic to the brain: A case report.

Cureus [Internet]. 2019; Available from: <http://dx.doi.org/10.7759/cureus.4728>

70. García-Fontán E-M, Cañizares-Carretero M-Á, Blanco-Ramos M, Matilla-González J-M, Carrasco-Rodríguez R, Barreiro-Morandeira F, et al. Prognostic significance of histopathological factors in survival and recurrence of atypical carcinoid tumours. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* [Internet]. 2021;32(6):904–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/icvts/ivab026>
71. Garg R, Bal A, Das A, Singh N, Singh H. Proliferation marker (ki67) in sub-categorization of neuroendocrine tumours of the lung. *Turk Patoloji Derg* [Internet]. 2018; Available from: <http://dx.doi.org/10.5146/tjpath.2018.01436>
72. Gheorghişan-Gălăţeanu A-A, Ilieşiu A, Lambrescu IM, Țăpoi DA. The complex histopathological and immunohistochemical spectrum of neuroendocrine tumors—an overview of the latest classifications. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2023;24(2):1418. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms24021418>
73. Giacinto D, Rota P, Rizza F, Campana L, Isidori D, Lania A, et al. Chromogranin A: from laboratory to clinical aspects of patients with neuroendocrine tumors. *Int J Endocrinol*. 2018; 8126087. doi: 10.1155/2018/8126087
74. Ginalis EE, Jumah F, Raju B, Xiong Z, Nanda A. Intramedullary spinal cord metastasis from primary lung neuroendocrine carcinoma: A case report and operative video. *World Neurosurg* [Internet]. 2021;145:426–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.wneu.2020.08.103>
75. Gkolfinopoulos S, Tsapakidis K, Papadimitriou K, Papamichael D, Kountourakis P. Chromogranin A as a valid marker in oncology: Clinical application or false hopes? *World J Methodol* [Internet]. 2017;7(1):9. Available from: <http://dx.doi.org/10.5662/wjm.v7.i1.9>
76. Gosain R, Mukherjee S, Yendamuri S, Iyer R. Management of typical and atypical pulmonary carcinoids based on different established guidelines.



- Cancers (Basel) [Internet]. 2018;10(12):510. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/cancers10120510>
77. Grasselly C, Denis M, Bourguignon A, Talhi N, Mathe D, Tourette A, et al. The antitumor activity of combinations of cytotoxic chemotherapy and immune checkpoint inhibitors is model-dependent. *Front Immunol* [Internet]. 2018;9. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2018.02100>
78. Grigg C, Rizvi NA. PD-L1 biomarker testing for non-small cell lung cancer: truth or fiction? *J Immunother Cancer* [Internet]. 2016;4(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s40425-016-0153-x>
79. Guirgis HM. The impact of PD-L1 on survival and value of the immune check point inhibitors in non-small-cell lung cancer; proposal, policies and perspective. *J Immunother Cancer* [Internet]. 2018;6(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s40425-018-0320-3>
80. Gupta S, Gupta P, Rohilla M, Gupta N, Srinivasan R, Rajwanshi A, et al. Neuroendocrine carcinomas: Cytological mimics and diagnostic dilemmas. *Diagn Cytopathol* [Internet]. 2020;48(5):440–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/dc.24386>
81. Guryanov VG, Lyakh YE, Parii VD. Posibnik z biostatistiki. Analiz rezul'tativ medichnikh doslidzhen' u paketi EZR (R-STATISTICS) / Navchal'nii posibnik. Vol. 206. Kyiv: Vistka; 2018.
82. Ha SY, Choi M, Lee T, Park C-K. The prognostic role of mitotic index in hepatocellular carcinoma patients after curative hepatectomy. *Cancer Res Treat* [Internet]. 2016;48(1):180–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.4143/crt.2014.321>
83. Han B, Sun J-M, Ahn JS, Park K, Ahn M-J. Clinical outcomes of atypical carcinoid tumors of the lung and thymus: 7-year experience of a rare malignancy at single institute. *Med Oncol* [Internet]. 2013;30(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s12032-013-0479-x>
84. Hendifar AE, Marchevsky AM, Tuli R. Neuroendocrine tumors of the lung: Current challenges and advances in the diagnosis and management of well-

- differentiated disease. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2017;12(3):425–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtho.2016.11.2222>
85. Herde RF, Kokeny KE, Reddy CB, Akerley WL, Hu N, Boltax JP, et al. Primary pulmonary carcinoid tumor: A long-term single institution experience. *Am J Clin Oncol* [Internet]. 2018;41(1):24–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/coc.0000000000000221>
86. Hermans BCM, de Vos-Geelen J, Derks JL, Latten L, Liem IH, van der Zwan JM, et al. Unique metastatic patterns in neuroendocrine neoplasms of different primary origin. *Neuroendocrinology* [Internet]. 2021;111(11):1111–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1159/000513249>
87. Hilal T. Current understanding and approach to well differentiated lung neuroendocrine tumors: an update on classification and management. *Ther Adv Med Oncol* [Internet]. 2017;9(3):189–99. Available from: <http://dx.doi.org/10.1177/1758834016678149>
88. Hofland J, Kaltsas G, de Herder WW. Advances in the diagnosis and management of well-differentiated neuroendocrine neoplasms. *Endocr Rev* [Internet]. 2020;41(2):371–403. Available from: <http://dx.doi.org/10.1210/edrev/bnz004>
89. Huang W, Nebiolo C, Esbona K, Hu R, Lloyd R. Ki67 index and mitotic count: Correlation and variables affecting the accuracy of the quantification in endocrine/neuroendocrine tumors. *Ann Diagn Pathol* [Internet]. 2020;48(151586):151586. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2020.151586>
90. Hung YP. Neuroendocrine tumors of the lung. *Surg Pathol Clin* [Internet]. 2019;12(4):1055–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.path.2019.08.012>
91. Iarc – international agency for research on cancer [Internet]. Iarc.fr. [cited 2023 Oct 20]. Available from: <http://iarc.fr>
92. Ichiki Y, Matsumiya H, Mori M, Kanayama M, Nabe Y, Taira A, et al. Predictive factors of postoperative survival among patients with pulmonary

- neuroendocrine tumor. *J Thorac Dis* [Internet]. 2018;10(12):6912–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.21037/jtd.2018.11.115>
93. Inoue T, Nakazato Y, Karube Y, Maeda S, Kobayashi S, Chida M. Mitosis count and number of cancer cells in cases of primary pulmonary adenocarcinoma: Correlations among phosphorylated histone 3, number of cancer cells, nuclear grade, pathologic features and prognosis. *Pathol Int* [Internet]. 2018;68(3):159–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/pin.12635>
94. Inzani F, Petrone G, Fadda G, Rindi G. Cyto-histology in NET: what is necessary today and what is the future? *Rev Endocr Metab Disord* [Internet]. 2017;18(4):381–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s11154-017-9428-x>
95. Iyoda A, Azuma Y, Sano A. Neuroendocrine tumors of the lung: clinicopathological and molecular features. *Surg Today* [Internet]. 2020;50(12):1578–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00595-020-01988-7>
96. Jackson AS, Rosental A, Cattoni M, Bograd AJ, Farivar AS, Aye RW, et al. A staging system for neuroendocrine tumors of the lung needs to incorporate histological grade. *The Annals of thoracic surgery* [Internet]. 2020;109:1009–18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.athocarsur.2019.09.053>
97. Jakubíková L. Atypical course of typical lung carcinoid. *Klin Onkol* [Internet]. 2020;33(4):302–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.14735/amko2020302>
98. Jiang T, Sun H, Li N, Jiang T. Metastasis pattern and prognosis of large cell neuroendocrine carcinoma: a population-based study. *J Cancer Res Clin Oncol* [Internet]. 2023; Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00432-023-04975-w>
99. Joseph MG, Shibani A, Panjwani N, Arab A, Shepherd J, Stitt LW, et al. Usefulness of Ki-67, mitoses, and tumor size for predicting metastasis in carcinoid tumors of the lung: A study of 48 cases at a tertiary care centre in

- Canada. Lung Cancer Int [Internet]. 2015;2015:1–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/545601>
100. Kasajima A, Konukiewitz B, Oka N, Suzuki H, Sakurada A, Okada Y, et al. Clinicopathological profiling of lung carcinoids with a Ki67 index > 20%. Neuroendocrinology [Internet]. 2019;108(2):109–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1159/000495806>
101. Kesrouani C, Ghorra C, Rassy M. Distribution and characteristics of pulmonary neuroendocrine tumors: single institution experience in Lebanon. Asian Pac. J Cancer Prev. 2016;17(5):2579–81.
102. Kim J-Y, Jeong HS, Chung T, Kim M, Lee JH, Jung WH, et al. The value of phosphohistone H3 as a proliferation marker for evaluating invasive breast cancers: A comparative study with Ki67. Oncotarget [Internet]. 2017;8(39):65064–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.17775>
103. Kim ST, Ha SY, Lee S, Ahn S, Lee J, Park SH, et al. The impact of PD-L1 expression in patients with metastatic GEP-NETs. J Cancer [Internet]. 2016;7(5):484–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.7150/jca.13711>
104. Kinslow CJ, May MS, Saqi A, Shu CA, Chaudhary KR, Wang TJC, et al. Large-cell neuroendocrine carcinoma of the lung: A population-based study. Clin Lung Cancer [Internet]. 2020;21(2):e99–113. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clcc.2019.07.011>
105. Klöppel G. Oberndorfer and his successors: From carcinoid to neuroendocrine carcinoma. Endocr Pathol [Internet]. 2007;18(3):141–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s12022-007-0021-9>
106. Kneuertz PJ, Kamel MK, Stiles BM, Lee BE, Rahouma M, Harrison SW, et al. Incidence and prognostic significance of carcinoid lymph node metastases. Ann Thorac Surg [Internet]. 2018;106(4):981–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.athoracsur.2018.05.044>
107. Kriegsmann K, Zgorzelski C, Muley T, Christopoulos P, Thomas M, Winter H, et al. Role of Synaptophysin, Chromogranin and CD56 in

- adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung lacking morphological features of neuroendocrine differentiation: a retrospective large-scale study on 1170 tissue samples. *BMC Cancer* [Internet]. 2021;21(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12885-021-08140-9>
108. Кваченюк АМ, Кваченюк ДА. Нейроэндокринные опухоли: аспекты диагностики (обзор литературы). *INT J OF ENDOCRINOL* [Internet]. 2021;16(1):44–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.22141/2224-0721.16.1.2020.199127>
109. Kyriakopoulos G, Mavroeidi V, Chatzellis E, Kaltsas GA, Alexandraki KI. Histopathological, immunohistochemical, genetic and molecular markers of neuroendocrine neoplasms. *Ann Transl Med* [Internet]. 2018;6(12):252–252. Available from: <http://dx.doi.org/10.21037/atm.2018.06.27>
110. La Rosa S, Uccella S. Classification of neuroendocrine neoplasms: lights and shadows. *Rev Endocr Metab Disord* [Internet]. 2021;22(3):527–38. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s11154-020-09612-2>
111. La Salvia A, Persano I, Trevisi E, Parlagreco E, Muratori L, Scagliotti GV, et al. Ocular metastases from neuroendocrine tumors: A literature review. *Semin Oncol* [Internet]. 2020;47(2–3):144–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.seminoncol.2020.04.003>
112. Laflamme P, Mansoori BK, Sazanova O, Orain M, Couture C, Simard S, et al. Phospho-histone-H3 immunostaining for pulmonary carcinoids: impact on clinical appraisal, interobserver correlation, and diagnostic processing efficiency. *Hum Pathol* [Internet]. 2020;106:74–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2020.09.009>
113. Lampaki S, Kioumis I, Pitsiou G. Lung cancer and lung metastases. *Med Hypothesis Discov Innov Ophthalmol*. 2014;3:40–4.
114. Lee I, Gould VE, Moll R, Wiedenmann B, Franke WW. Synaptophysin expressed in the bronchopulmonary tract: Neuroendocrine cells, neuroepithelial bodies, and neuroendocrine neoplasms. *Differentiation*

- [Internet]. 1987;34(2):115–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-0436.1987.tb00057.x>
115. Li M, Yang L, Lu H. Pulmonary combined large cell neuroendocrine carcinoma. *Pathol Oncol Res* [Internet]. 2022;28. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/pore.2022.1610747>
116. Li W, Cohen MB. TTF-1, napsin A and CDX2 co-expression in metastatic rectal adenocarcinoma to the lung. *Cytopathology* [Internet]. 2021;32(1):146–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/cyt.12884>
117. Limaiem F, Tariq MA, Wallen J. Lung carcinoid tumors. *StatPearls* [Internet] Treasure Island. 2021.
118. Lin X, Zhou M, Xu Z, Chen Y, Lin F. Bioinformatics study on genes related to a high-risk postoperative recurrence of lung adenocarcinoma. *Sci Prog* [Internet]. 2021;104(3):003685042110180. Available from: <http://dx.doi.org/10.1177/00368504211018053>
119. Liu C-F, Tao Y-J. Based on SEER database: Population distribution, survival analysis, and prognostic factors of organ metastasis of lung large cell neuroendocrine carcinoma. *Front Oncol* [Internet]. 2022;12. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2022.810170>
120. Liu S-L, Nie Y-H, He T, Yan X-X, Xing Y-Q. Iris metastasis as the first sign of small cell lung cancer: A case report. *Oncol Lett* [Internet]. 2017;13(3):1547–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.3892/ol.2017.5648>
121. Liu X, Wang R, Li M, Chen G. Pituitary metastasis of lung neuroendocrine carcinoma mimicking pituitary adenoma: Case report and literature review. *Front Endocrinol (Lausanne)* [Internet]. 2021;12. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fendo.2021.678947>
122. Lotz C, Lamour V. The interplay between DNA topoisomerase 2 $\alpha$  post-translational modifications and drug resistance. *Canc Drug Resist* [Internet]. 2020;3(2):149–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.20517/cdr.2019.114>
123. Makuku R, Khalili N, Razi S, Keshavarz-Fathi M, Rezaei N. Current and future perspectives of PD-1/PDL-1 blockade in cancer immunotherapy. *J*

- Immunol Res [Internet]. 2021;2021:1–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2021/6661406>
124. Manem VSK, Sazonova O, Gagné A, Orain M, Khoshkrood-Mansoori B, Gaudreault N, et al. Unravelling actionable biology using transcriptomic data to integrate mitotic index and Ki-67 in the management of lung neuroendocrine tumors. *Oncotarget* [Internet]. 2021;12(3):209–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.27874>
125. Marchevsky AM, Hendifar A, Walts AE. The use of Ki-67 labeling index to grade pulmonary well-differentiated neuroendocrine neoplasms: current best evidence. *Mod Pathol* [Internet]. 2018;31(10):1523–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41379-018-0076-9>
126. Marchiò C, Gatti G, Massa F, Bertero L, Filosso P, Pelosi G, et al. Distinctive pathological and clinical features of lung carcinoids with high proliferation index. *Virchows Arch* [Internet]. 2017;471(6):713–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00428-017-2177-0>
127. Megyesfalvi Z, Gay CM, Popper H, Pirker R, Ostoros G, Heeke S, et al. Clinical insights into small cell lung cancer: Tumor heterogeneity, diagnosis, therapy, and future directions. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2023; Available from: <http://dx.doi.org/10.3322/caac.21785>
128. Melosky B. Advanced typical and atypical carcinoid tumours of the lung: Management recommendations. *Curr Oncol* [Internet]. 2018;25(11):86–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.3747/co.25.3808>
129. Melosky B. Low grade neuroendocrine tumors of the lung. *Front Oncol* [Internet]. 2017;7. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2017.00119>
130. Metovic J, Barella M, Bianchi F, Hofman P, Hofman V, Remmelink M, et al. Morphologic and molecular classification of lung neuroendocrine neoplasms. *Virchows Arch* [Internet]. 2021;478(1):5–19. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00428-020-03015-z>
131. Metovic J, Bianchi F, Rossi G, Barella M, Sonzogni A, Harari S, et al. Recent advances and current controversies in lung neuroendocrine

- neoplasms☆. *Semin Diagn Pathol* [Internet]. 2021;38(5):90–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.semdp.2021.03.002>
132. Milione M, Maisonneuve P, Grillo F, Mangogna A, Centonze G, Prinzi N, et al. Ki-67 index of 55% distinguishes two groups of bronchopulmonary pure and composite large cell neuroendocrine carcinomas with distinct prognosis. *Neuroendocrinology* [Internet]. 2021;111(5):475–89. Available from: <http://dx.doi.org/10.1159/000508376>
133. Mindaye ET, Kassahun M, Tigiye G. Bronchial carcinoid tumor in the era of covid-19 pandemic: A case report. *Int J Surg Case Rep* [Internet]. 2021;80(105703):105703. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijscr.2021.105703>
134. Mirzaiian E, Tabatabaei Ghods ZS, Tavangar SM, Emami B, Oraie M, Safyari R, et al. Utility of PHH3 in evaluation of mitotic index in breast carcinoma and impact on tumor grade. *Asian Pac J Cancer Prev* [Internet]. 2020;21(1):63–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.31557/apjcp.2020.21.1.63>
135. Mishra DK, Rocha HJ, Miller R, Kim MP. Immune cells inhibit the tumor metastasis in the 4D cellular lung model by reducing the number of live circulating tumor cells. *Sci Rep* [Internet]. 2018;8(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-34983-7>
136. Muhd H, Zuhaimy H, Ismail MF, Arshad F, Azmi S, Sahak NH. Orbital metastasis as the initial presentation of breast cancer. *Malays Fam Physician*. 2020;15(3):74–8.
137. Naheed S, Holden C, Tanno L, Jaynes E, Cave J, Ottensmeier CH, et al. The utility of Ki-67 as a prognostic biomarker in pulmonary neuroendocrine tumours: protocol for a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open* [Internet]. 2019;9(8):e031531. Available from: <http://dx.doi.org/10.1136/bmjopen-2019-031531>
138. Neubauer E, Wirtz RM, Kaemmerer D, Athelougou M, Schmidt L, Sanger J, et al. Comparative evaluation of three proliferation markers, Ki-67,



- TOP2A, and RacGAP1, in bronchopulmonary neuroendocrine neoplasms: Issues and prospects. *Oncotarget* [Internet]. 2016;7(27):41959–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.9747>
139. Nicholas V, Say B, Aasi SZ, Rieger KE, Brown RA. TTF-1 expression in a case of cutaneous sarcomatoid squamous cell carcinoma. *J Cutan Pathol* [Internet]. 2021;48(6):821–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/cup.13963>
140. Nicholson AG, Tsao MS, Beasley MB, Borczuk AC, Brambilla E, Cooper WA, et al. The 2021 WHO classification of lung tumors: Impact of advances since 2015. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2022;17(3):362–87. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtho.2021.11.003>
141. Nicholson SA, Beasley MB, Brambilla E, Hasleton PS, Colby TV, Sheppard MN, et al. Small cell lung carcinoma (SCLC): A clinicopathologic study of 100 cases with surgical specimens. *Am J Surg Pathol* [Internet]. 2002;26(9):1184–97. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/00000478-200209000-00009>
142. Niotis A, Tsiambas E, Fotiades PP, Ragos V. Ki67 and Topoisomerase IIa proliferation markers in colon adenocarcinoma. *J BUON*. 2018;12(7):24–7.
143. Niu F-Y, Zhou Q, Yang J-J, Zhong W-Z, Chen Z-H, Deng W, et al. Distribution and prognosis of uncommon metastases from non-small cell lung cancer. *BMC Cancer* [Internet]. 2016;16(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12885-016-2169-5>
144. Noguchi M, Furukawa KT, Morimoto M. Pulmonary neuroendocrine cells: physiology, tissue homeostasis and disease. *Dis Model Mech* [Internet]. 2020;13(12). Available from: <http://dx.doi.org/10.1242/dmm.046920>
145. Nuñez-Valdovinos B, Carmona-Bayonas A, Jimenez-Fonseca P, Capdevila J, Castaño-Pascual Á, Benavent M, et al. Neuroendocrine tumor heterogeneity adds uncertainty to the World Health Organization 2010 classification: Real-world data from the Spanish tumor registry (R-GETNE).

- Oncologist [Internet]. 2018;23(4):422–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1634/theoncologist.2017-0364>
146. Oberg K, Hellman P, Ferolla P, Papotti M. Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Neuroendocrine bronchial and thymic tumors. *Ann Oncol* [Internet]. 2012;23(7):120–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mds267>
147. Oka N, Kasajima A, Konukiewitz B, Sakurada A, Okada Y, Kameya T, et al. Classification and prognostic stratification of bronchopulmonary neuroendocrine neoplasms. *Neuroendocrinology* [Internet]. 2020;110(5):393–403. Available from: <http://dx.doi.org/10.1159/000502776>
148. Oronsky B, Ma PC, Morgensztern D, Carter CA. Nothing but NET: A review of neuroendocrine tumors and carcinomas. *Neoplasia* [Internet]. 2017;19(12):991–1002. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neo.2017.09.002>
149. Ozturk Sari S, Taskin OC, Gundogdu G, Yegen G, Onder S, Keskin M, et al. The impact of phosphohistone-H3-assisted mitotic count and Ki67 score in the determination of tumor grade and prediction of distant metastasis in well-differentiated pancreatic neuroendocrine tumors. *Endocr Pathol* [Internet]. 2016;27(2):162–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s12022-016-9424-9>
150. Panzuto F, Maccauro M, Campana D, Faggiano A, Massironi S, Pusceddu S, et al. Impact of the SARS-CoV2 pandemic dissemination on the management of neuroendocrine neoplasia in Italy: a report from the Italian Association for Neuroendocrine Tumors (Itanet). *J Endocrinol Invest* [Internet]. 2021;44(5):989–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s40618-020-01393-4>
151. Pathipati MP, Yohannan TK, Tian L, Hornbacker K, Benson JA, Berry GJ, et al. Examination of factors associated with lymph node metastases in lung carcinoids: Results from a single institution retrospective cohort study.

- Lung Cancer [Internet]. 2021;154:186–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lungcan.2021.01.017>
152. Pathologyoutlines.com. [cited 2023 Oct 18]. Available from: <https://www.pathologyoutlines.com/topic/stainsck7.html>.
153. Paulsen E-E, Kilvaer TK, Khanekhenari MR. Assessing PD-L1 and PD-1 in non-small cell lung cancer: a novel immunoscore approach. Clin Lung Cancer [Internet]. 2017;18(2):220–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clcc.2016.09/009>
154. Pavel M, Kidd M, Modlin I. Systemic therapeutic options for carcinoid. Semin Oncol [Internet]. 2013;40(1):84–99. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.seminoncol.2012.11.003>
155. PDL1 22C3 [Internet]. Pathologyoutlines.com. [cited 2023 Oct 19]. Available from: <https://www.pathologyoutlines.com/topic/stainsPDL1.html>
156. Pelosi G, Fabbri A, Cossa M, Sonzogni A, Valeri B, Righi L, et al. What clinicians are asking pathologists when dealing with lung neuroendocrine neoplasms? Semin Diagn Pathol [Internet]. 2015;32(6):469–79. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.semmdp.2015.10.009>
157. Pelosi G, Massa F, Gatti G, Righi L, Volante M, Birocco N, et al. Ki-67 evaluation for clinical decision in metastatic lung carcinoids: A proof of concept. Clin Pathol [Internet]. 2019;12:2632010X1982925. Available from: <http://dx.doi.org/10.1177/2632010x19829259>
158. Pelosi G, Scarpa A, Forest F, Sonzogni A. The impact of immunohistochemistry on the classification of lung tumors. Expert Rev Respir Med [Internet]. 2016;10(10):1105–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/17476348.2017.1235975>
159. Pelosi G, Sonzogni A, Harari S, Albini A, Bresaola E, Marchiò C, et al. Classification of pulmonary neuroendocrine tumors: new insights. Transl Lung Cancer Res [Internet]. 2017;6(5):513–29. Available from: <http://dx.doi.org/10.21037/tlcr.2017.09.04>

160. Pericleous M, Karpathakis A, Toumpanakis C, Lungair H, Reiner J, Marelli L, et al. Well-differentiated bronchial neuroendocrine tumors: Clinical management and outcomes in 105 patients. *Clin Respir J* [Internet]. 2018;12(3):904–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/crj.12603>
161. Pinato DJ, Vallipuram A, Evans JS. Programmed cell death ligands expression drives immune tolerogenesis across the diverse subtypes of neuroendocrine tumors. *Neuroendocrinology* [Internet]. 2021;111(5):465–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1159/000506745>
162. Pinto JA, Raez LE, Oliveres H, Rolfo CC. Current knowledge of Ipilimumab and its use in treating non-small cell lung cancer. *Expert Opin Biol Ther* [Internet]. 2019;19(6):509–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/14712598.2019.1610380>
163. Popper H, Brcic L. Diagnosis and molecular profiles of large cell neuroendocrine carcinoma with potential targets for therapy. *Front Oncol* [Internet]. 2021;11. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2021.655752>
164. Poslavska O, Shponka I. Morphometric and immunohistochemical features of TTF-1 positive lung tumors: improvement of approaches to the diagnosis of unknown primary sites metastases. *Sci Med Sci* [Internet]. 2020;0(2 (35)):29–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.15587/2519-4798.2020.199841>
165. Prinzi N, Rossi RE, Proto C, Leuzzi G, Raimondi A, Torchio M, et al. Recent advances in the management of typical and atypical lung carcinoids. *Clin Lung Cancer* [Internet]. 2021;22(3):161–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clcc.2020.12.004>
166. Ragavan M, Das M. Systemic therapy of extensive stage small cell lung cancer in the era of immunotherapy. *Curr Treat Options Oncol* [Internet]. 2020;21(8). Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s11864-020-00762->
167. Ramirez RA, Chauhan A, Gimenez J, Thomas KEH, Kokodis I, Voros BA. Management of pulmonary neuroendocrine tumors. *Rev Endocr Metab*

- Disord [Internet]. 2017;18(4):433–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s11154-017-9429-9>
168. Ramirez RA, Thomas K, Jacob A, Lin K, Bren-Mattison Y, Chauhan A. Adjuvant therapy for lung neuroendocrine neoplasms. *World J Clin Oncol* [Internet]. 2021;12(8):664–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.5306/wjco.v12.i8.664>
169. Randhawa S, Trikalinos N, Patterson GA. Neuroendocrine tumors of the lung. *Thorac Surg Clin* [Internet]. 2021;31(4):469–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.thorsurg.2021.05.005>
170. Raphael MJ, Chan DL, Law C, Singh S. Principles of diagnosis and management of neuroendocrine tumours. *CMAJ* [Internet]. 2017;189(10):E398–404. Available from: <http://dx.doi.org/10.1503/cmaj.160771>
171. Raso MG, Bota-Rabassedas N, Wistuba II. Pathology and classification of SCLC. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2021;13(4):820. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/cancers13040820>
172. Reed CT, Duma N, Halfdanarson T, Buckner J. Primary neuroendocrine carcinoma of the brain. *BMJ Case Rep* [Internet]. 2019;12(9):e230582. Available from: <http://dx.doi.org/10.1136/bcr-2019-230582>
173. Rekhtman N, Desmeules P, Litvak AM, Pietanza MC, Santos-Zabala ML, Ni A, et al. Stage IV lung carcinoids: spectrum and evolution of proliferation rate, focusing on variants with elevated proliferation indices. *Mod Pathol* [Internet]. 2019;32(8):1106–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41379-019-0248-2>
174. Rekhtman N. Lung neuroendocrine neoplasms: recent progress and persistent challenges. *Mod Pathol* [Internet]. 2022;35:36–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41379-021-00943-2>
175. Rekhtman N. Neuroendocrine tumors of the lung: An update. *Arch Pathol Lab Med* [Internet]. 2010;134(11):1628–38. Available from: <http://dx.doi.org/10.5858/2009-0583-rar.1>

176. Righi L, Gatti G, Volante M, Papotti M. Lung neuroendocrine tumors: pathological characteristics. *J Thorac Dis* [Internet]. 2017;9(S15):S1442–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.21037/jtd.2017.01.59>
177. Riihimäki M, Hemminki A, Sundquist K, Sundquist J, Hemminki K. The epidemiology of metastases in neuroendocrine tumors. *Int J Cancer* [Internet]. 2016;139(12):2679–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.30400>
178. Rindi G, Inzani F. Neuroendocrine neoplasm update: toward universal nomenclature. *Endocr Relat Cancer* [Internet]. 2020;27(6):R211–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1530/erc-20-0036>
179. Robelin P, Hadoux J, Forestier J, Planchard D, Hervieu V, Berdelou A, et al. Characterization, prognosis, and treatment of patients with metastatic lung carcinoid tumors. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2019;14(6):993–1002. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtho.2019.02.002>
180. Rossi G, Bertero L, Marchiò C, Papotti M. Molecular alterations of neuroendocrine tumours of the lung. *Histopathology* [Internet]. 2018;72(1):142–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/his.13394>
181. Rouquette Lassalle I. Tumeurs neuroendocrines pulmonaires et lésions préneoplasiques. *Ann Pathol* [Internet]. 2016;36(1):34–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.annpat.2015.11.008>
182. Rudin CM, Brambilla E, Faivre-Finn C, Sage J. Small-cell lung cancer. *Nat Rev Dis Primers* [Internet]. 2021;7(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41572-020-00235-0>
183. Saber M, Ismail Y, Alieldin N, Loay I, El Zawahry M. Neuroendocrine tumors of the lung: A five-year retrospective experience of Egyptian NCI (2010–2014). *J Egypt Natl Canc Inst* [Internet]. 2018;30(4):151–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnci.2018.10.005>
184. Sadowski SM, Christ E, Bédard B, Kollár A, Karenovics W, Perren A, et al. Nationwide multicenter study on the management of pulmonary

- neuroendocrine (carcinoid) tumors. *Endocr Connect* [Internet]. 2018;7(1):8–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1530/ec-17-0271>
185. Sadrzadeh H, Kline G, editors. *Endocrine biomarkers: Clinicians and clinical chemists in partnership*. Philadelphia, PA: Elsevier Science Publishing; 2017.
186. Saito T, Tsuta K, Fukumoto KJ, Matsui H, Konobu T, Torii Y, et al. Combined small cell lung carcinoma and giant cell carcinoma: a case report. *Surg Case Rep* [Internet]. 2017;3(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s40792-017-0328-9>
187. Salah S, Khader J, Yousef Y, Salem A, Al-Hussaini M, Al-Asady R. Choroidal metastases as the sole initial presentation of metastatic lung cancer: Case report and review of literature. *Nepal J Ophthalmol* [Internet]. 2012;4(2):339–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.3126/nepjoph.v4i2.6559>
188. Salhab M, Migdady Y, Xiong Y. Immunohistochemical expression and prognostic value of PD-L1 in extrapulmonary small cell carcinoma: a single institution experience. *J ImmunoTher Cancer* [Internet]. 2018;(6). Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s40425-08-0359-1>
189. Sanguedolce F, Zanelli M, Palicelli A, Cavazza A, de Marco L, Zizzo M, et al. The classification of neuroendocrine neoplasms of the lung and digestive system according to WHO, 5th edition: similarities, differences, challenges, and unmet needs. *Panminerva Med* [Internet]. 2022;64(2). Available from: <http://dx.doi.org/10.23736/s0031-0808.22.04602-x>
190. Santiago-Naranjo KC, Ilaiwy A. Pulmonary carcinoid presenting with persistent pneumothorax. *BMJ Case Rep* [Internet]. 2019;12(11):e231083. Available from: <http://dx.doi.org/10.1136/bcr-2019-231083>
191. Savu C, Melinte A, Diaconu C, Stiru O, Gherghiceanu F, Tudorica Ștefan, et al. Lung neuroendocrine tumors: A systematic literature review (Review). *Exp Ther Med* [Internet]. 2021;23(2). Available from: <http://dx.doi.org/10.3892/etm.2021.11099>

192. Saxena R, Pathak M, Shukla R, Sinha A, Elhence P, Bharti JN, et al. Bronchial carcinoid tumour as a rare cause of Cushing's syndrome in children: A case report and review of literature. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* [Internet]. 2020;12(4):340–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.4274/jcrpe.galenos.2019.2019.0156>
193. Sayeg Y, Sayeg M, Baum R, Kulkarni H, Presselt N, Mäder I, et al. Neuroendokrine Neoplasien der Lunge. *Pneumologie* [Internet]. 2014;68(07):456–77. Available from: <http://dx.doi.org/10.1055/s-0034-1365642>
194. Sazonova O, Manem V, Orain M, Khoshkrood-Mansoori B, Gaudreault N, Desmeules P, et al. Transcriptomic data helps refining classification of pulmonary carcinoid tumors with increased mitotic counts. *Mod Pathol* [Internet]. 2020;33(9):1712–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41379-020-0538-8>
195. Schnabel PA, Junker K. Pulmonale neuroendokrine Tumoren in der neuen WHO-Klassifikation 2015: Beginn eines Aufbruchs zu „neuen Ufern“? *Pathologe* [Internet]. 2015;36(3):283–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00292-015-0030-2>
196. Seneda AL, Faculty of Medicine, Department of Surgery and Orthopedics, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, Brazil, Lopez Lapa RM, Felix TF, Minutentag IW, Campos CF, et al. Typical lung carcinoids with metastasis: Potential role of MicroRNAs in the regulation of adaptive immunity associated with disease: A case study. *Cell Physiol Biochem* [Internet]. 2021;55(S2):1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.33594/000000320>
197. Shah S, Gosain R, Groman A, Gosain R, Dasari A, Halfdanarson TR, et al. Incidence and survival outcomes in patients with lung neuroendocrine neoplasms in the United States. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2021;13(8):1753. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/cancers13081753>



198. Shen X, Zhao B. Efficacy of PD-1 or PD-L1 inhibitors and PD-L1 expression status in cancer: meta-analysis. *BMJ* [Internet]. 2018;k3529. Available from: <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.k3529>
199. Shibuya M. Welcoming the new WHO classification of pituitary tumors 2017: revolution in TTF-1-positive posterior pituitary tumors. *Brain Tumor Pathol* [Internet]. 2018;35(2):62–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10014-018-0311-6>
200. Singh N, Kulkarni P, Aggarwal AN, Mittal BR, Gupta N, Behera D, et al. Choroidal metastasis as a presenting manifestation of lung cancer: A report of 3 cases and systematic review of the literature. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 2012;91(4):179–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/md.0b013e3182574a0b>
201. Singh S, Granberg D, Wolin E, Warner R, Sissons M, Kolarova T, et al. Patient-reported burden of a neuroendocrine tumor (NET) diagnosis: Results from the first global survey of patients with NETs. *J Glob Oncol* [Internet]. 2017;3(1):43–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1200/jgo.2015.002980>
202. Songül Ş, Şebnem B, Övgü A, Tülin Ö, Akif T, Büge Ö. Programmed death-ligand-1 expression in non-small cell lung cancer and prognosis. *Balkan Med J* [Internet]. 2019;36(3):184–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.4274/balkanmedj.galenos.2018.2018.0392>
203. Soni A, Dogeas E, Juluri KR, Wolfgang CL, Hruban RH, Weiss MJ. The tail of neuroendocrine tumors from lung to pancreas: Two rare case reports. *Int J Surg Case Rep* [Internet]. 2014;5(8):537–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijscr.2014.03.021>
204. Spurgeon L, Jones J, Lewis A, Rammohan K, Shaheen F, Weaver J, et al. The occurrence and associated risk factors of brain metastases in well differentiated grade 1 and 2 bronchial neuroendocrine tumours: A single centre retrospective analysis of 280 patients. *J Neuroendocrinol* [Internet]. 2022;34(7). Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/jne.13180>

205. Sugimoto A, Umemura S, Miyoshi T, Nakai T, Kuroe T, Nosaki K, et al. High proportion of tumor necrosis predicts poor survival in surgically resected high-grade neuroendocrine carcinoma of the lung. *Lung Cancer* [Internet]. 2021;157:1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lungcan.2021.05.018>
206. Suteau V, Collin A, Menei P, Rodien P, Rousselet M-C, Briet C. Expression of programmed death-ligand 1 (PD-L1) in human pituitary neuroendocrine tumor. *Cancer Immunol Immunother* [Internet]. 2020;69(10):2053–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00262-020-02611-x>
207. Swinson DEB, Jones JL, Richardson D, Cox G, Edwards JG, O’Byrne KJ. Tumour necrosis is an independent prognostic marker in non-small cell lung cancer: correlation with biological variables. *Lung Cancer* [Internet]. 2002;37(3):235–40. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s0169-5002\(02\)00172-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0169-5002(02)00172-1)
208. Takada K, Okamoto T, Toyokawa G, Kozuma Y, Matsubara T, Haratake N, et al. The expression of PD-L1 protein as a prognostic factor in lung squamous cell carcinoma. *Lung Cancer* [Internet]. 2017;104:7–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lungcan.2016.12.006>
209. Tariq S, Kim SY, Monteiro de Oliveira Novaes J, Cheng H. Update 2021: Management of small cell lung cancer. *Lung* [Internet]. 2021;199(6):579–87. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00408-021-00486-y>
210. Tazdait M, Mezquita L, Lahmar J, Ferrara R, Bidault F, Ammari S, et al. Patterns of responses in metastatic NSCLC during PD-1 or PDL-1 inhibitor therapy: Comparison of RECIST 1.1, irRECIST and iRECIST criteria. *Eur J Cancer* [Internet]. 2018;88:38–47. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2017.10.017>
211. Teitelbaum SL. The carcinoid. *Am J Surg* [Internet]. 1972;123(5):564–72. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0002-9610\(72\)90221-8](http://dx.doi.org/10.1016/0002-9610(72)90221-8)

212. Thoracic Tumors. WHO Classification of Tumors. 2021;13:978–9283245063.
213. Tracht J, Zhang K, Peker D. Grading and prognostication of neuroendocrine tumors of the pancreas: A comparison study of Ki67 and PHH3. *J Histochem Cytochem* [Internet]. 2017;65(7):399–405. Available from: <http://dx.doi.org/10.1369/0022155417708186>
214. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB, et al. The 2015 world health organization classification of lung tumors. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2015;10(9):1243–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/jto.0000000000000630>
215. Tsoukalas N, Baxevas P, Aravantinou-Fatorou E, Tolia M, Galanopoulos M, Tsapakidis K, et al. Advances on systemic treatment for lung neuroendocrine neoplasms. *Ann Transl Med* [Internet]. 2018;6(8):146–146. Available from: <http://dx.doi.org/10.21037/atm.2018.04.03>
216. Tsuruoka K, Horinouchi H, Goto Y, Kanda S, Fujiwara Y, Nokihara H, et al. PD-L1 expression in neuroendocrine tumors of the lung. *Lung Cancer* [Internet]. 2017;108:115–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lungcan.2017.03.006>
217. Tsuta K, Liu DC, Kalhor N, Wistuba II, Moran CA. Using the mitosis-specific marker anti-phosphohistone H3 to assess mitosis in pulmonary neuroendocrine carcinomas. *Am J Clin Pathol* [Internet]. 2011;136(2):252–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1309/ajcpdxfoxgef0rp>
218. Umakanthan S, Chalapathi Rao AV, Mohammed W. Role of immunohistochemistry markers in neoplastic lung lesions. *J Cancer Res Ther* [Internet]. 2021;17(6):1382. Available from: [http://dx.doi.org/10.4103/jcrt.jcrt\\_187\\_19](http://dx.doi.org/10.4103/jcrt.jcrt_187_19)
219. Uppin S, Pasala US, Hui M, Kumar N, Bhaskar K, Paramjyothi GK. Clinicopathological and immunohistochemical study of pulmonary neuroendocrine tumors – A single-institute experience. *Lung India* [Internet].

- 2021;38(2):134. Available from: [http://dx.doi.org/10.4103/lungindia.lungindia\\_482\\_19](http://dx.doi.org/10.4103/lungindia.lungindia_482_19)
220. Van Acker HH, Capsomidis A, Smits EL, Van Tendeloo VF. CD56 in the immune system: More than a marker for cytotoxicity? *Front Immunol* [Internet]. 2017;8. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2017.00892>
221. van Steenhoven JEC, Kuijter A, Kornegoor R, van Leeuwen G, van Gorp J, van Dalen T, et al. Assessment of tumour proliferation by use of the mitotic activity index, and Ki67 and phosphohistone H3 expression, in early-stage luminal breast cancer. *Histopathology* [Internet]. 2020;77(4):579–87. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/his.14185>
222. van Velthuysen M-LF, Groen EJ, van der Noort V, van de Pol A, Tesselaar MET, Korse CM. Grading of neuroendocrine neoplasms: Mitoses and Ki-67 are both essential. *Neuroendocrinology* [Internet]. 2014;100(2–3):221–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1159/000369275>
223. Varghese S. Isolated ocular metastases from lung cancer. *J Community Support Oncol* [Internet]. 2018;16(2):e106–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.12788/jcso.0258>
224. Veterinen T, Kuopio T, Ahtiainen M. PD-1 and PD-L1 expression in pulmonary carcinoid tumors and their association to tumor spread. *Endocrine Connections*. 2019;8(8):1168–75.
225. Vidarsdottir H, Tran L, Nodin B, Jirström K, Planck M, Jönsson P, et al. Immunohistochemical profiles in primary lung cancers and epithelial pulmonary metastases. *Hum Pathol* [Internet]. 2019;84:221–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2018.10.009>
226. Vidarsdottir H, Tran L, Nodin B, Jirström K, Planck M, Mattsson JSM, et al. Comparison of three different TTF-1 clones in resected primary lung cancer and epithelial pulmonary metastases. *Am J Clin Pathol* [Internet]. 2018;150(6):533–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/ajcp/axy083>

227. Villani V, Mahadevan KK, Ligorio M, Fernández-del Castillo C, Ting DT, Sabbatino F, et al. Phosphorylated histone H3 (PHH3) is a superior proliferation marker for prognosis of pancreatic neuroendocrine tumors. *Ann Surg Oncol* [Internet]. 2016;23(S5):609–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1245/s10434-016-5171-x>
228. Voss SM, Riley MP, Lokhandwala PM, Wang M, Yang Z. Mitotic count by phosphohistone H3 immunohistochemical staining predicts survival and improves interobserver reproducibility in well-differentiated neuroendocrine tumors of the pancreas. *Am J Surg Pathol* [Internet]. 2015;39(1):13–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/pas.0000000000000341>
229. Walters SL, Canavan ME, Salazar MC, Resio BJ, Blasberg JD, Mase V, et al. A national study of surgically managed atypical pulmonary carcinoid tumors. *Ann Thorac Surg* [Internet]. 2021;112(3):921–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.athoracsur.2020.09.029>
230. Wang H, Sun L, Bao H, Wang A, Zhang P, Wu X, et al. Genomic dissection of gastrointestinal and lung neuroendocrine neoplasm. *Clin J Cancer Res* [Internet]. 2019;31(6):918–29. Available from: <http://dx.doi.org/10.21147/j.jssn.1000-6904.2019.06.08>
231. Wang H-Y, Li Z-W, Sun W, Yang X, Zhou L-X, Huang X-Z, et al. Automated quantification of Ki-67 index associates with pathologic grade of pulmonary neuroendocrine tumors. *Chin Med J (Engl)* [Internet]. 2019;132(5):551–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/cm9.000000000000109>
232. Wang J, Ye L, Cai H, Jin M. Comparative study of large cell neuroendocrine carcinoma and small cell lung carcinoma in high-grade neuroendocrine tumors of the lung: a large population-based study. *J Cancer* [Internet]. 2019;10(18):4226–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.7150/jca.33367>
233. Wang L, Dou X, Liu T, Lu W, Ma Y, Yang Y. Tumor size and lymph node metastasis are prognostic markers of small cell lung cancer in a Chinese

- population. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 2018;97(31):e11712. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/md.00000000000011712>
234. Wang VE, Urisman A, Albacker L. Checkpoint is active against large cell neuroendocrine carcinoma with high tumor mutation burden. *J Immunother Cancer* [Internet]. 2017;5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/40425-017-0281-y>
235. Warth A, on behalf of the Pulmonary Pathology Working Group of the German Society of Pathology, Fink L, Fisseler-Eckhoff A, Jonigk D, Keller M, et al. Interobserver agreement of proliferation index (Ki-67) outperforms mitotic count in pulmonary carcinoids. *Virchows Arch* [Internet]. 2013;462(5):507–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00428-013-1408-2>
236. WHO Classification of Tumours Editorial Board. In: *Thoracic Tumours WHO Classification of Tumours*. 2021. p. 127–50.
237. Wick MR, Marchevsky AM. Neuroendocrine neoplasms of the lung: Concepts and terminology. *Semin Diagn Pathol* [Internet]. 2015;32(6):445–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.semdp.2015.09.012>
238. Williams JF, Vivero M. Diagnostic criteria and evolving molecular characterisation of pulmonary neuroendocrine carcinomas. *Histopathology* [Internet]. 2022;81(5):556–68. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/his.14714>
239. Wurtz A, Benhamed L, Conti M, Bouchindhomme B, Porte H. Results of systematic nodal dissection in typical and atypical carcinoid tumors of the lung. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2009;4(3):388–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/jto.0b013e3181951aa6>
240. Yang L, Fan Y, Lu H. Pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma. *Pathol Oncol Res* [Internet]. 2022;28. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/pore.2022.1610730>
241. Yatabe Y, Dacic S, Borczuk AC, Warth A, Russell PA, Lantuejoul S, et al. Best practices recommendations for diagnostic immunohistochemistry in

- lung cancer. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2019;14(3):377–407. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtho.2018.12.005>
242. Yin X, Li Y, Wang H, Jia T, Wang E, Luo Y, et al. Small cell lung cancer transformation: From pathogenesis to treatment. *Semin Cancer Biol* [Internet]. 2022;86:595–606. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2022.03.006>
243. Youlden DR, Foresto SA, Aitken JF. Primary malignant lung tumors in children: A report from the Australian Childhood Cancer Registry, 1983-2015. *Pediatr Pulmonol* [Internet]. 2020;55(3):719–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/ppul.24636>
244. Yu L, Dong Y, Xue J, Xu S, Wang G, Kuang D, et al. SOX11 is a sensitive and specific marker for pulmonary high-grade neuroendocrine tumors. *Diagn Pathol* [Internet]. 2022;17(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13000-021-01186-0>
245. Zahel T, Krysa S, Herpel E, Stenzinger A, Goeppert B, Schirmacher P, et al. Phenotyping of pulmonary carcinoids and a Ki-67-based grading approach. *Virchows Arch* [Internet]. 2012;460(3):299–308. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00428-012-1194-2>
246. Zhang J, Yu Q, He Y, Hu T, Chen K, Yang Z, et al. The cancers-specific survival of metastatic pulmonary carcinoids and sites of distant metastasis: A population-based study. *Technol Cancer Res Treat* [Internet]. 2021;20:153303382110365. Available from: <http://dx.doi.org/10.1177/15330338211036528>
247. Zhang Y, Wang W, Hu Q, Liang Z, Zhou P, Tang Y, et al. Clinic and genetic similarity assessments of atypical carcinoid, neuroendocrine neoplasm with atypical carcinoid morphology and elevated mitotic count and large cell neuroendocrine carcinoma. *BMC Cancer* [Internet]. 2022;22(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12885-022-09391-w>

248. Zi Y, Yu M, Ma T. Mechanisms underlying low-clinical responses to PD-1/PD-L1 blocking antibodies in immunotherapy of cancer: a key role of PD-L1. *J Immunother Cancer*. 2021;9(1).
249. Опанасенко М.С., Конік Б.М., Клименко В.І., Кононенко В.А., Терешкович А.В., Калениченко М.І., та ін. Карциноід легені: огляд літератури та власне спостереження. *Укр. пульмонол. журнал*. 2013;4:48-53
250. Попко С.С., Євтушенко В.М., Сирцов В.К. Нейроендокринна система легень: сучасний стан та перспективи подальших досліджень (огляд літератури). *Буковин. Мед. Вісн.* 2019;23(3):131-137. — doi: 10.24061/2413-0737.XXIV.3.91.2019.73
251. Пославська В.О., Усова О.М. Нейроендокринні пухлини з невідомого первинного джерела: імуногістохімічні та морфометричні особливості. *Вісник Вінницького нац. мед. ун-ту*, 2019;23(1):143-147.
252. Федоренко З.П., Михайлович Ю.Й., Гулак Л.О., Михайлович Ю.Й., Горох Є.Л., Рижов А.Ю., та ін. Рак в Україні, 2019–2020. Захворюваність, смертність, показники діяльності онкологічної служби. *Бюлетень Національного канцер-реєстру України №22*. 2021. — 134 с



## ДОДАТОК А

## Додаткова схема оцінки клінічного перебігу НЕН легень

Морфологічні та імуногістохімічні критерії, що свідчать про		Grade 2 помірно диференційовані НЕП легень (АС)	Grade 3 агресивні, низько диференційовані НЕК легень (LCNEC і SCLC)
прогресію пухлини		<ul style="list-style-type: none"> <li>• відсутність експресії ChrA</li> </ul>	
високий ризик наявності метастазів	регіонарних	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\geq 7</math> мітозів у 10 полях зору мікроскопа</li> <li>• Ki-67 <math>\geq 18</math></li> <li>• TOP2A &gt;13%</li> </ul>	
	віддалених	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &gt;10 мітозів у 10 полях зору мікроскопа</li> </ul>	
значне зменшення загальної виживаності		<ul style="list-style-type: none"> <li>• великі вогнища некрозу</li> <li>• TOP2A &gt;13%</li> <li>• наявність експресії PD-L1 (без імунотерапії)</li> </ul>	

## ДОДАТОК Б

## Наукові публікації за темою дисертації

1. L.M. Zakhartseva, H.Ye. Chytaieva. Predictive value of morphological features and proliferative markers (mitotic index, Ki-67, PNH3) in bronchopulmonary neuroendocrine tumors. Патологія. 2021, T18, №3(53): 254–262. doi: 10.14739/2310-1237.2021.3.239530. (Web of Science). (Автор здійснила збір матеріалу, разом зі співавтором провела гістологічне дослідження, провела імуногістохімічне дослідження, узагальнила та проаналізувала отримані дані, сформулювала висновки, підготувала статтю до друку).

2. TOP2A expression as the essential predictive factor in lung neuroendocrine tumors. H.E. Chytaieva, L.M. Zakhartseva. Клінічна онкологія. — 2021, T11, №3–4 (43–44): 1–6. doi: 10.32471/clinicaloncology.2663-466X.43-3.28396. (Автор провела аналіз літератури, збір матеріалу, разом зі співавтором провела гістологічне дослідження, провела імуногістохімічне дослідження, узагальнила та проаналізувала отримані дані, сформулювала висновки, підготувала статтю до друку).

3. Chytaieva H., Shkurupii B., Zakhartseva L. Correlation between expression of immunohistochemical markers and morphology in lung neuroendocrine neoplasms. Ukr. Scientific Medical Youth Journal. 2022; 1 (128): 6–18. doi: 10.32345/USMYJ.1(128).2022.6-18. (Автор здійснила збір матеріалу, разом зі співавторами провела гістологічне та імуногістохімічне дослідження, підготувала ілюстративний матеріал, узагальнила та проаналізувала одержані дані, сформулювала висновки, підготувала статтю до друку).

4. Рівень експресії Ki-67 як індикатор метастатичного ураження при нейроендокринних новоутвореннях легені. Читаєва Г.Є. Клінічна онкологія. — 2022, T12, №3–4 (47–48): 1–5. doi: 10.32471/clinicaloncology.2663-466X.47-3.29448.

5. Chytaieva H.E., Zakhartseva L.M. PD-L1 expression in bronchopulmonary neuroendocrine tumors: correlation with morphological features and prognosis. Deutscher Wissenschaftsherold. German Science Herald, 2021; 2: 15–23. doi: 10.19221/202123. (Автор здійснила відбір матеріалу, разом зі

співавтором провела гістологічне дослідження, провела імуногістохімічне дослідження, узагальнила та проаналізувала отримані дані, сформулювала висновки, підготувала статтю до друку).

6. L.M. Zakhartseva, H.E. Chytaieva, O.V. Artemov. Clinical case of non-typical metastasis of neuroendocrine lung carcinoma to the vascular membrane of the eye. *Exp. Oncol.*, 2022; 44 (2): 169–173. doi: 10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-44-no-2.17969. (Scopus). (Автор здійснила збір матеріалу, підготувала огляд літератури, разом зі співавторами провела гістологічне та імуногістохімічне дослідження, інтерпретацію даних клінічних досліджень, підготувала ілюстративний матеріал, оформила статтю до друку).

## ДОДАТОК В

## Відомості про апробацію результатів дисертації

1. G.E. Chitaeva, L.M. Zakhartseva. Anonymous metastases of neuroendocrine tumors: definition of neoplasm's primary location according to morphological study and immuno-staining. Матеріали конф. молодих вчених «Фундаментальна медицина: інтегральні підходи до терапії хворих з онкопатологією» (м. Київ, 4–5 лютого 2019 р.) (тези). — Онкологія. 2019, Т21, №1:74.

2. Захарцева Л.М., Читаєва Г.Є. Оцінка прогностичної цінності панелі антитіл (хромогранін А, синаптофізин, СК7, СКпан, CD56, TTF-1 та Кі-67) при нейроендокринних пухлинах бронхолегеневої локалізації. Матеріали міжнар. наук.-практ. конф. «Сучасна патоморфологічна діагностика в клінічній практиці лікаря». Вінниця, 10–11 квітня 2019 р. (тези). — Матеріали наук.-практ. конф. — Вінниця: Твори, 2019. — С.70–71.

3. Zakhartseva L.M., Chytaieva G.E., Guz' O.O., Zakhartsev Yu.O. Estimation of TTF-1, CK5/6, CK7, CD56, Chromogranin A, and Synaptophysin expression as an auxiliary aspect of neuroendocrine and other non-small cell lung tumors differential diagnosis in small biopsies. (31st European Congress of Pathology in Nice). Nice, France 7–11 September, 2019 (poster). 31st European Congress of Pathology in Nice (Final Programme) — P.101.

4. Читаєва Г.Є., Захарцева Л.М. Экспрессия top2α: дополнительный маркер оценки агрессивности нейроэндокринных опухолей бронхолегочной локализации. Міжнародна медична онлайн конф. «Наукові дослідження патологоанатомів України: досягнення та перспективи розвитку», Київ, 22–23 квітня 2021 р. (тези). — Ukr. Scientific Medical Youth Journal. 2021; suppl. 2(123):37–38.

5. Читаєва Г.Є. Захарцева Л.М. Особливості метастатичного враження при нейроендокринних карциномах легень, морфологічні і

імуногістохімічні прогностичні фактор»; IV конф. Укр. дивізіону Інтернаціональної Академії Патології «Сучасна онкопатологія: морфогенез, патоморфологічна діагностика і прогноз пухлин», Запоріжжя, 16 вересня 2021. (усна доповідь); сертифікат учасника.

6. Читаєва Г.Є., Захарцева Л.М. Прогностична цінність морфологічних критеріїв та індексу проліферативної активності (рівень експресії Ki-67) при нейроендокринних пухлинах легень. онлайн конф. «Патологічна анатомія — основа всіх клінічних дисциплін: вимоги сьогодення». Київ, 18–19 лист., 2021 р. (тези). — Ukr. Scientific Medical Youth Journal. 2021; suppl. 3(126):24–25.